

*Università degli Studi di Napoli  
Federico II*



*Scuola di Dottorato in  
Biologia Avanzata*

XXIV ciclo

***“Aspetti molecolari, funzionali ed  
evolutivi dei recettori nucleari  
nel controllo endocrino della  
spermatogenesi”***

**Tutore**

Prof. Gaetano Ciarcia

**Dottoranda**

Letizia Francesca

**Cotutore**

Prof. Alfredo Ciccodicola

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>pag.3</b>
<b>1.1 Recettori Nucleari</b>	<b>pag.4</b>
<b>1.2 Recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi</b>	<b>pag.11</b>
<b>1.2.1 Struttura dei geni</b>	<b>pag.11</b>
<b>1.2.2 Espressione e funzione dei geni</b>	<b>pag.14</b>
<b>1.3 Il gene <i>PPARG</i></b>	<b>pag.17</b>
<b>1.3.1 Struttura del gene</b>	<b>pag.17</b>
<b>1.3.2 Espressione e funzioni del gene</b>	<b>pag.19</b>
<b>1.4 Recettori degli estrogeni</b>	<b>pag.21</b>
<b>1.4.1 Struttura dei geni</b>	<b>pag.21</b>
<b>1.4.2 Espressione e funzione dei geni</b>	<b>pag.29</b>
<b>1.5 Il gene <i>ESR2</i></b>	<b>pag.33</b>
<b>1.5.1 Struttura del gene</b>	<b>pag.33</b>
<b>1.5.2 Espressione e funzioni del gene</b>	<b>pag.35</b>
<b>1.6 Asse ipotalamo-ipofisi</b>	<b>pag.39</b>
<b>1.7 Spermatogenesi</b>	<b>pag.42</b>
<b>1.8 Spermatogenesi e variazioni dei livelli degli ormoni sessuali         nel modello <i>Podarcis sicula</i></b>	<b>pag.44</b>
<b>2 SCOPO</b>	<b>pag.49</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b>	<b>pag.55</b>
<b>3.1 Animali</b>	<b>pag.56</b>
<b>3.2 Estrazione di RNA dai tessuti</b>	<b>pag.56</b>
<b>3.3 Gel di agoroso per RNA in tampone MOPS</b>	<b>pag.58</b>
<b>3.4 EXPERION<sup>TM</sup> RNA HIGHSSENS ANALYSIS KIT</b>	<b>pag.59</b>
<b>3.5 Trattamento con DNasi dell'RNA estratto</b>	<b>pag.61</b>

3.6	PCR	pag.62
3.7	RT-PCR	pag.66
3.8	Elettroforesi su gel di agarosio	pag.67
3.9	<i>Real-Time</i> PCR	pag.69
3.10	Purificazione dei prodotti di PCR dal gel di agarosio	pag.73
3.11	Vettore Plasmidico	pag.74
3.12	Estrazione del DNA plasmidico (Midipreparazione)	pag.76
3.13	Reazione di sequenza	pag.77
3.14	ANALISI BIOINFORMATICA	pag.79
4	RISULTATI	pag.85
4.1	Identificazione e sequenziamento del gene <i>PPARG</i>	pag.86
4.2	Identificazione e sequenziamento del gene <i>ESR2</i>	pag.87
4.3	Analisi bioinformatica ed evolutiva del recettore <i>PPAR<math>\gamma</math></i>	pag.89
4.4	Analisi bioinformatica ed evolutiva del recettore <i>ER<math>\beta</math></i>	pag.92
4.5	Analisi di espressione del gene <i>PPARG</i> nel ciclo riproduttivo	pag.94
4.6	Analisi di espressione del gene <i>ESR2</i> nel ciclo riproduttivo	pag.95
4.7	Espressione dei geni <i>PPARG</i> ed <i>ESR2</i> nel ciclo riproduttivo	pag.96
4.8	Analisi <i>in silico</i> dei geni <i>PPARG</i> ed <i>ESR2</i>	pag.98
4.9	Identificazione e caratterizzazione di una nuova isoforma del gene <i>PPARG</i> in tessuti tumorali	pag.99
5	DISCUSSIONE	pag.146
6	BIBLIOGRAFIA	pag.158

## **1. Introduzione**



## 1.1 Recettori Nucleari

Negli organismi pluricellulari, la capacità di regolare funzioni vitali come la riproduzione, lo sviluppo e il metabolismo, ha coinciso con l'evoluzione di una delle classi più importanti di fattori di trascrizione, la superfamiglia dei recettori nucleari (NR, *Nuclear Receptor*) (Bookout *et al.*, 2006). Dapprima queste proteine sono state identificate come mediatori del segnale dell'ormone steroideo ed hanno fornito un sostanziale collegamento tra gli studi sulla regolazione trascrizionale e la fisiologia. Nella metà degli anni '80 sono stati clonati i recettori per gli steroidi (Chawla *et al.*, 2001), e grazie alla notevole similarità di sequenza, sia amminoacidica che nucleotidica, lo *screening* di numerose librerie di cDNA ha successivamente guidato all'isolamento di un numero di recettori nucleari più grande di quanto ipotizzato in precedenza.

Ad oggi, la superfamiglia dei recettori nucleari nella specie umana è composta da una cinquantina di geni e più di 75 proteine, in *Drosophila melanogaster* i recettori nucleari sono circa 21 e ben 270 in *Caenorhabditis elegans* (Maglich *et al.*, 2001; Robinson-Rechavi *et al.*, 2001; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

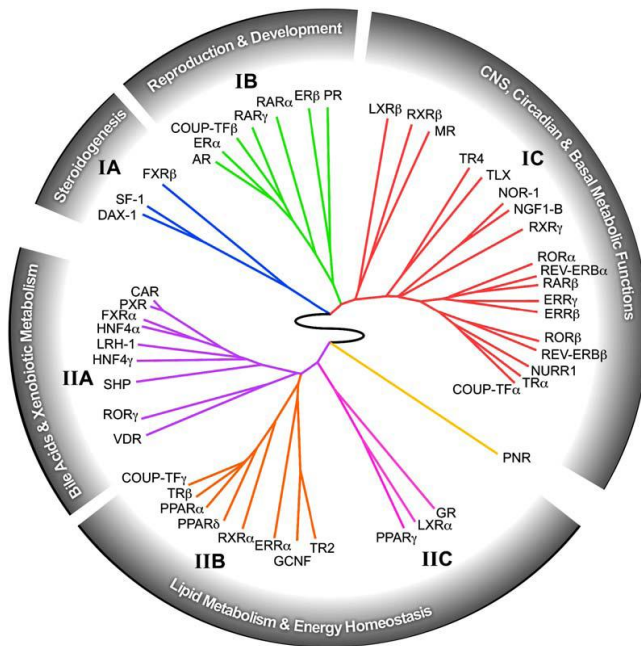
L'elevato numero dei membri di questa famiglia deriva dalla loro capacità di funzionare come sensori ligando-dipendenti per diversi ormoni liposolubili (steroidi, retinoidi, ormoni tiroidei), vitamine, acidi grassi, ossisteroli e numerosi xenobiotici lipidici derivati dalla dieta, che possono attraversare la membrana plasmatica e raggiungere il recettore, attivando così un meccanismo a cascata di trasduzione del segnale (Chawla *et al.*, 2001).

Della superfamiglia dei NR fanno parte i recettori per gli ormoni steroidei, come il recettore per gli estrogeni (ER, *Estrogen Receptor*), per gli androgeni (AR, *Androgen Receptor*), per i progestinici (PR, *Progesterone Receptor*), per i gluco- e i mineralcorticoidi (GR, *Glucocorticoid Receptor*; MR, *Mineralcorticoid Receptor*), per

l'ormone tiroideo (TR, *Tyroid Receptor*) e per la vitamina D3 (VDR, *Vitamin D Receptor*) (Olefsky, 2001). Questi recettori si legano al DNA generalmente come omodimeri ed i loro ligandi sono sintetizzati per lo più da sorgenti endocrine endogene regolate da un meccanismo a *feedback* negativo dall'asse ipotalamo-ipofisi.

Membri dei NR sono anche i recettori che legano diversi prodotti del metabolismo dei lipidi, quali acidi grassi e prostaglandine, e che funzionano normalmente come eterodimeri con il recettore X dei retinoidi (RXR, *Retinoid-X Receptor*). Tra i membri di questa famiglia vi sono i recettori per gli acidi grassi (PPAR, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), ossisteroli (LXR, *Liver-X Receptor*), acidi biliari (FXR, *Farnesoid-X Receptor*) e xenobiotici (SXR, *Steroid Xenobiotic Receptor*; PXR, *Pregnane-X Receptor* e CAR, *Constitutive Androstane Receptor*). Il legame del ligando a ognuno di questi recettori attiva una cascata metabolica che mantiene l'omeostasi lipidica, regolando generalmente l'espressione di geni coinvolti nel metabolismo, accumulo, trasporto ed eliminazione dei lipidi.

Esistono inoltre molti NR che operano come monomeri, i cui ligandi naturali non sono ancora conosciuti e vengono perciò definiti recettori orfani (Mangelsdorf *and* Evans, 1995). Ne sono un esempio i recettori ERR (*Estrogen Related Receptor*) che posseggono una struttura molto simile a quella dei recettori estrogenici  $\alpha$  e  $\beta$ , sebbene non sia stata ancora dimostrata la loro capacità di legare l'ormone steroideo 17 $\beta$ -estradiolo (E<sub>2</sub>) o di formare *in vivo* dei dimeri con i recettori ER (Figura 1).



**Figura 1:** Dendrogramma circolare della superfamiglia dei recettori nucleari e loro funzioni correlate (Bookout *et al.*, 2006).

I recettori nucleari agiscono come regolatori positivi o negativi dell'espressione genica: in seguito ad attivazione, e quindi al legame col proprio ligando, vanno incontro ad una modificazione conformazionale che stimola la dissociazione dalle proteine HSP *chaperonine*, (HSP, *Heat Shock Proteins*), e la successiva dimerizzazione col *partner* proteico. Le proteine *Heat Shock*, normalmente legate al recettore inattivo, hanno la funzione di aiutare il corretto *folding* e di garantire un'efficace risposta cellulare in presenza del ligando (Picard, 1998; Murdoch *and* Gorski, 1991). In seguito alla traslocazione nucleare, per quei recettori ancora localizzati in sede extranucleare, il complesso dimerico recettore-ligando, riconosce sul genoma specifiche sequenze note come elementi di risposta all'ormone (HRE, *Hormone Responsive Element*). Le HRE sono composte da due copie di sequenze esanucleotidiche, derivate da eventi di mutazione e duplicazione genica della sequenza ancestrale 5'-AGGTCA-3'.

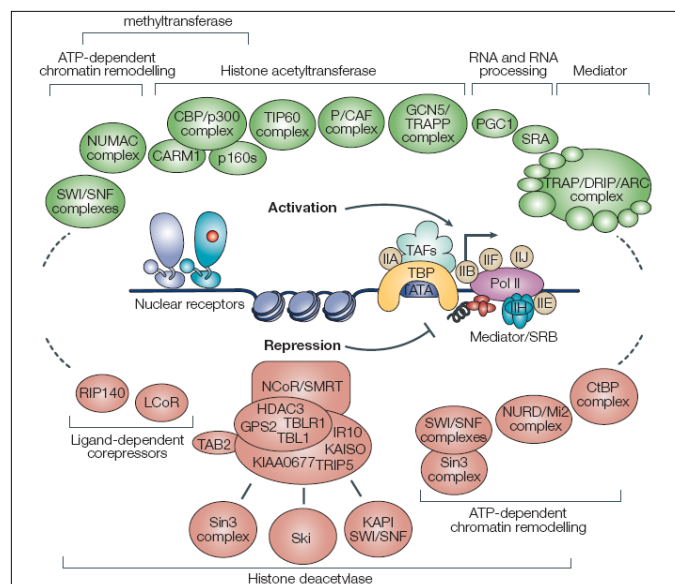
Ciascuna delle due sequenze costituisce una *half-site sequence* ed il numero di basi che le separano, così come la grandezza del motivo ed il suo orientamento,

determinano anche quale recettore si leghi ad uno specifico elemento di risposta (Glass, 1994). Generalmente, i recettori per gli steroidi riconoscono sequenze palindromiche (*inverted repeat*), mentre i recettori che formano eterodimeri con RXR legano ripetizioni dirette del tipo *direct repeat* o *everted repeat*. Sebbene le sequenze consenso siano diverse per ciascun recettore nucleare, la specifica *consensus* di ogni NR è spesso ben conservata tra le diverse specie di mammiferi.

Solitamente, la loro azione consente il rimodellamento localizzato della cromatina, permettendo alla RNA polimerasi II di dare inizio alla trascrizione del gene, sino alla cessazione o attenuazione del segnale cellulare (Kininis and Klaus, 2008; Acevedo and Kraus, 2004; McKenna *et al.*, 1999; Métivier *et al.*, 2006). Questo è il modello predominante nel caso dei recettori degli steroidi, come il recettore glucocorticoide (GR) e il recettore dell'estrogeno (ER) (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1995), tuttavia diversi recettori nucleari possono anche promuovere eventi di repressione trascrizionale ligando-dipendente legandosi ad elementi di risposta negativa o contrapponendosi all'attività trascrizionale di altri classi di fattori di trascrizione, attraverso un effetto noto come "trans-repressione". I recettori nucleari sono in grado di interagire con un elevato numero di proteine accessorie che permettono il contatto tra il dimero, la cromatina ed il macchinario di trascrizione basale, promuovendo o inibendo l'espressione genica (Rosen *et al.*, 2001).

Sebbene esistano anche proteine che non hanno alcun effetto diretto sulla struttura del DNA, ma che operano nel reclutamento o nel rilascio di complessi coregolatori, la classe dei cofattori può essere generalmente suddivisa in due categorie principali: (1) proteine che agiscono mediante modifiche covalenti degli istoni (acetilazione/deacetilazione, metilazione/demetilazione, fosforilazione/defosforilazione o ubiquitinazione/deubiquitinazione), e (2) cofattori ATP-dipendenti per il

rimodellamento della cromatina. Tra le proteine che fungono da coattivatori, un ruolo importante è svolto dai membri delle famiglie p160 (SRC-1/TIF2/GRIP-1/ACTR), p/CIP, p300/CBP, PGC-1, PRIP, PCG-2 e ARA 70 e da altri fattori trascrizionali specifici per i recettori ormonali nucleari (Castillo *et al.*, 1999); alla classe dei corepressori appartengono SMRT (*Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor*) ed N-Cor (*Nuclear receptor Corepressor*) RIP-140 (*Receptor Interacting Protein 140*) che alterano i meccanismi con cui viene arruolato il macchinario di trascrizione attraverso il legame con le istone-deacetilasi (Di Renzo *et al.*, 1997; Francis *et al.*, 2003). Questi cofattori di regolazione non sono esclusivi dei recettori nucleari, ma sono utilizzati in modo simile da numerose altre proteine che legano il DNA (McKenna *et al.*, 1999) (Figura 2).



**Figura 2:** Complessi di coattivatori (in verde) e corepressori (in rosso) richiesti per la regolazione trascrizionale mediata dai recettori nucleari. Queste proteine possono avere esse stesse un'attività di istone acetiltrasferasi o deacetilasi oppure, in alternativa, possono legare proteine con questa funzione che permettono uno svolgimento o un avvolgimento, rispettivamente, della cromatina consentendo o meno alla RNA polimerasi II di dare luogo alla trascrizione (Perissi and Rosenfeld, 2005).

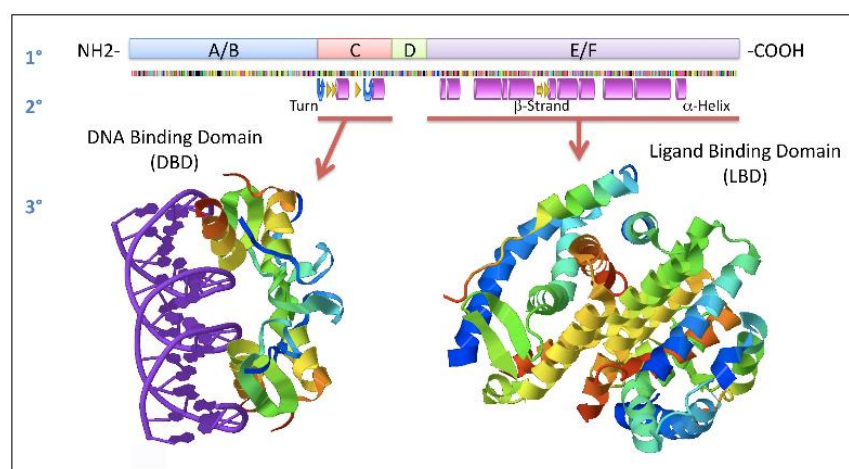
Sebbene, nella maggior parte dei casi il recettore si lega come dimero alle due copie della sequenza HRE, i recettori nucleari possono legare le sequenze dei geni bersaglio sul DNA anche tramite un legame indiretto proteina-proteina (*tethering*), con altre classi di fattori di trascrizione come AP-1 (*Activator Protein 1*), Sp1 (*Stimulatory protein 1*), FOXA1 (*Forkhead box A1*), CREB (*CRE Binding*), e c-Myc (Klein-Hitpass *et al.*, 1988; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Carrol *et al.*, 2005; Carrol *et al.*, 2006; Kushner *et al.*, 2000), o mediare effetti rapidi non-genomici ad opera di recettori di membrana (Giguère, 1999). A sostegno di quest'ultimo modello sono ben note le interazioni del recettore degli estrogeni ER $\alpha$  con una serie di proteine di segnalazione tra cui Src, Shc, ras, PI3-chinasi e proteine G (Migliaccio *et al.*, 1996; Migliaccio *et al.*, 1998; Simoncini *et al.*, 2000; Wyckoff *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002).

Studi cristallografici hanno rivelato per i recettori nucleari una comune organizzazione modulare, composta da quattro, alle volte cinque domini, altamente conservata lungo la scala evolutiva (Guerriero, 2009).

La regione NH<sub>2</sub>-terminale, detta dominio A/B, conferisce la specificità d'azione di ciascun recettore poichè è la più variabile sia per lunghezza che per sequenza e comprende una funzione di attivazione trascrizionale (AF-1, *Activation Function-1*) che stimola la trascrizione di geni bersaglio in modo indipendente dal ligando.

Il dominio di legame al DNA, o dominio C (DBD, *DNA Binding Domain*) è quello più conservato evolutivamente tra tutti i recettori nucleari; esso è costituito da due motivi a dita di zinco (*zinc finger*), con quattro molecole di cisteina che coordinano un atomo di zinco, caratteristici delle proteine che legano il DNA. Il primo motivo *zinc finger* determina l'interazione con il solco maggiore, mentre il secondo contribuisce debolmente alla dimerizzazione del recettore, ed entrambi sono riuniti in una struttura globulare (Renaud and Moras, 2000).

Il dominio D è una regione di collegamento, che consente la flessibilità necessaria alla proteina per il contatto tra il dominio C ed E, anche noto come dominio di legame al ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*), nella regione carbossi-terminale. Il dominio di legame al ligando, evolutivamente meno conservato rispetto al DBD, è costituito da 12  $\alpha$ -eliche (H1-H12) riunite in tre strati con un nucleo centrale idrofobico. L'interazione dell'LBD con il proprio ligando attiva la trascrizione attraverso un secondo dominio di trans-attivazione ligando-dipendente, noto come AF-2 (*Activation Function-2*), capace di reclutare i cofattori proteici. Per alcuni recettori, l'attivazione avviene tramite l'azione coordinata tra i domini AF-1 ed AF-2, tuttavia questo dipende dal tipo di cellula, dal promotore bersaglio, e dal tipo di ligando (Dalei *and* Mitchell, 1999). Inoltre, il dominio LBD gioca un ruolo importante sia per la traslocazione nucleare, grazie alla presenza della sequenza segnale NLS (*Nuclear Localization Signal*), che per il legame con le proteine *chaperonine*. Infine, alcuni recettori nucleari, tra cui i recettori per gli estrogeni, contengono un ulteriore dominio, denominato F, la cui esatta funzione non è ad oggi completamente chiarita (Griekspoor *et al.*, 2007) (Figura 3).



**Figura 3:** Struttura modulare, in domini, dei membri della superfamiglia dei recettori nucleari. Immagine fornita dal sito NNR *Nuclear Receptor Resource* (<http://nrresource.org/>).

L'elevata conservazione e la distribuzione pressochè ubiquitaria lungo il genoma di numerose specie evidenzia l'importanza biologica dei recettori nucleari: queste proteine infatti intervengono nella proliferazione e differenziazione cellulare, e partecipano alla regolazione di un gran numero di funzioni, quali la riproduzione, il metabolismo, il sistema cardiovascolare e quello nervoso (Bookout *et al.*, 2006). Non sorprende quindi lo sviluppo di un'enorme farmacopea per combattere quei disordini che riguardano ogni campo della medicina, inclusa la biologia della riproduzione e la crescita tumorale, e che manifestano un'inappropriato *pathway* dei recettori nucleari come principale meccanismo patologico (Chawla *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2004; Shulman and Mangelsdorf, 2005). Numerosi sono i recettori nucleari implicati nella regolazione della carcinogenesi, del ciclo cellulare e nel controllo dei processi apoptotici (Kersten *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2004; Shulman and Mangelsdorf, 2005). In particolare, è diventato sempre più evidente il coinvolgimento dei recettori nucleari PPAR $\gamma$  ed ER $\beta$  in patologie che comprendono la resistenza all'insulina, l'infertilità, l'infiammazione e, non ultima, il cancro.

## **1.2 Recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi**

### **1.2.1 Struttura dei geni**

I recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi (PPAR) sono recettori ormonali nucleari che mediano a livello trascrizionale gli effetti degli acidi grassi e dei loro derivati, intervenendo in numerose funzioni quali il metabolismo dei glucidi, dei lipidi, la proliferazione cellulare, il differenziamento, l'angiogenesi e l'infiammazione (Desvergne and Wahli, 1999).



La famiglia dei PPAR comprende fattori di trascrizione ligando-inducibili, inizialmente descritti nei roditori come recettori ormonali di composti che inducono la proliferazione dei perossisomi, molecole naturali che includono steroidi e lipidi.

Nell'uomo sono stati identificati tre geni PPAR: il gene *PPARA*, codificante il recettore hPPAR $\alpha$  (NR1C1), localizzato nella regione 22q12, in prossimità del telomero, che mappa sul cromosoma 22, il gene *PPARB*, codificante il recettore hPPAR $\beta/\delta$  (NR1C2), localizzato sul cromosoma 6, in posizione 6p21 ed infine il gene *PPARG*, codificante il recettore hPPAR $\gamma$  (NR1C3) localizzato sul cromosoma 3, nella regione 3p25 (Sher *et al.*, 1993; Issemann *et al.*, 1990; Costa *et al.*, 2010).

I geni PPAR mostrano una comune organizzazione nella struttura della regione codificante che consiste di sei esoni (Gearing *et al.*, 1994):

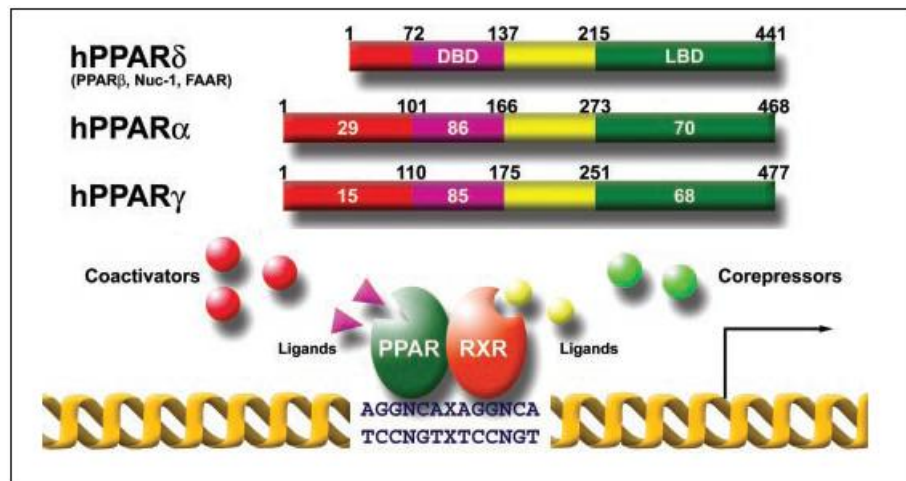
- un esone che codifica per il dominio A/B di transattivazione AF-1 ligando indipendente;
- due esoni che codificano per il dominio di legame al DNA (uno per ognuno dei due *zinc finger*);
- un esone che codifica per la regione di collegamento;
- due esoni che codificano il dominio di legame al ligando e di transattivazione ligando dipendente AF-2.

Il dominio di legame al DNA è il più conservato (85% d'identità) rispetto al dominio di legame al ligando (LBD) che mostra un'omologia del 70%.

Nella maggior parte dei casi, i recettori PPAR si legano preferenzialmente al motivo AGGTCA e sono caratterizzati dalla capacità di formare eterodimeri con il recettore dell'acido retinoico 9-cis (RXR).

L'elemento di risposta ai PPAR (PPRE, *Peroxisome Proliferator Response Element*) è una ripetizione diretta di 2 motivi di riconoscimento AGGTCA separati da

un nucleotide, definita DR1. Questa caratteristica si mantiene in tutte le sequenze PPRE identificate e permette di distinguerle dalle altre ripetizioni dirette che costituiscono elementi di risposta per altre classi recettoriali (Kliewer *et al.*, 1992) (Figura 4).



**Figura 4:** Struttura modulare dei tre recettori PPAR e meccanismo molecolare di azione (immagine modificata da Rosen *and* Spiegelman, 2001).

L'elemento PPRE in realtà ha una struttura più complessa costituita da un estremo 5' esteso, un *core* centrale DR1 imperfetto ed una Adenina come nucleotide che separa le ripetizioni dirette; la sequenza di PPRE, quindi, risulta essere: 5'-AACTAGGNCA A AGGTCA-3' e questo probabilmente favorisce la selettività di legame dell'eterodimero PPAR-RXR rispetto agli eterodimeri della stessa famiglia. La struttura del PPRE impone anche una specifica polarità al legame dell'eterodimero: il recettore PPAR interagisce con la sequenza esamerica a monte della ripetizione diretta, mentre RXR si lega a valle, al contrario di ciò che avviene per gli altri eterodimeri della stessa famiglia, e questa differenza è dovuta alla sequenza al 5' del PPRE (Ijpenberg *et al.*, 1997).

Il gene *PPARA* si estende per circa 30 kb ed è costituito da un totale di otto esoni: i primi due corrispondenti alla regione 5' UTR e l'ultimo comprendente l'LBD e

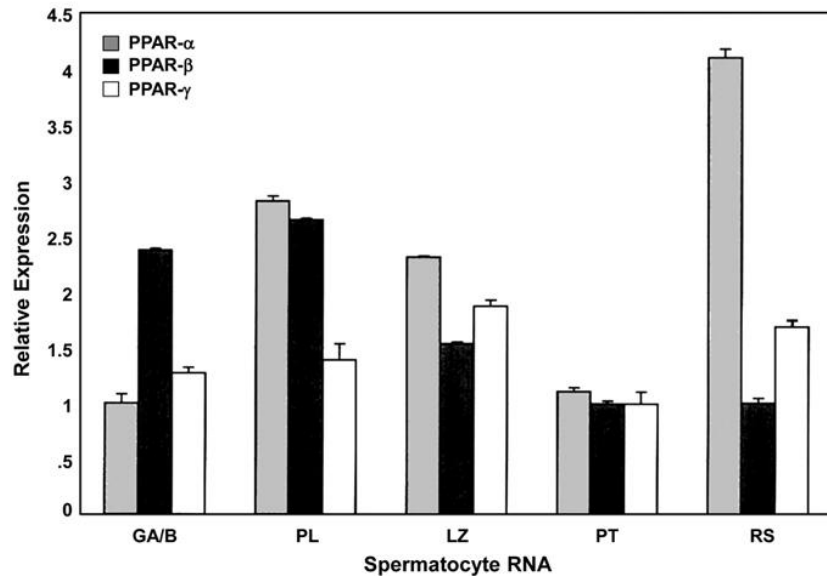
la regione 3' UTR. Il gene *PPARD* si estende in una regione di circa 85 kb ed è strutturato in sei esoni, mentre il gene *PPARG* si estende per più di 100 kb e dà origine ad almeno sei diversi mRNA,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\gamma 2ORF4$  e  $\gamma 3ORF4$  che differiscono per l'estremità 5' a causa di un differente utilizzo del promotore e dello *splicing* alternativo (Sabatino *et al.*, 2005). Gli acidi grassi ed i fibrati, composti ipolipidemici che costituiscono la principale classe di ligandi sintetici, sono stati i primi ligandi ad essere identificati, tuttavia i recettori PPAR hanno più di un ligando specifico, ed interagiscono con diversi tipi di ligandi naturali (Krey *et al.*, 1997). Gli acidi grassi ed i fibrati legano generalmente con elevata affinità il recettore PPAR $\alpha$ ; gli eicosanoidi, una classe di acidi grassi derivati dall'acido arachidonico, ed in particolare la prostaglandina 15-deossi- $\Delta 12,14$ -PGJ2, sono ligandi del recettore PPAR $\gamma$  (Forman *et al.*, 1995), così come i tiazolidenici ("TZD": troglitazone, pioglitazone, rosiglitazone), composti utilizzati come farmaci nel trattamento del diabete di tipo II (Lehmann *et al.*, 1995). La ricerca di ligandi naturali e sintetici per il recettore PPAR $\beta$  si è dimostrata più difficile, anche se sono stati isolati derivati dei fibrati, composti non-TZD, che fungono da agonisti per questo recettore (Berger *et al.*, 1999).

### **1.2.2 Espressione e funzione dei geni PPAR**

I recettori PPAR sono co-espressi in tessuti di origine embrionale ectodermica, mesodermica o endodermica, con livelli relativi che variano da un tipo cellulare ad un altro (Desvergne *and* Wahli, 1999). Il gene *PPARA* è espresso nel fegato, rene, intestino, cuore, muscolo scheletrico, tessuto adiposo bruno, pancreas e surrene. La sua espressione è legata ad un'intensa attività mitocondriale e di  $\beta$ -ossidazione perossisomale, come dimostrano gli elevati livelli di questa proteina nei cardiomiociti e

nelle cellule dei tubuli renali che utilizzano come fonte di energia gli acidi grassi (Auboeuf *et al.*, 1997). Il gene *PPARD* è espresso in tutti i tessuti analizzati anche se con livelli diversi, con un picco di espressione massima che si registra nella placenta e nell'intestino (Auboeuf *et al.*, 1997). I livelli di espressione del gene *PPARG* sono piuttosto elevati nel tessuto adiposo bianco e bruno e nell'epitelio intestinale e nel colon, anche se è stata riscontrata la sua espressione in altri tessuti: retina, muscolo scheletrico, organi linfoidi, placenta, cervello, fegato, polmone (Michalik *et al.*, 2002).

I recettori PPAR sono inoltre ampiamente espressi nell'apparato riproduttivo, sia femminile che maschile. In particolare, nel testicolo le tre proteine PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR  $\gamma$ , si ritrovano sia nelle cellule somatiche che in quelle germinali. Nel topo, i tre recettori PPAR sono espressi negli spermatogoni di tipo A e B, negli spermatociti e negli spermatatidi (Braissant *et al.*, 1996, Elbrecht *et al.*, 1996, Schultz *et al.*, 1999; Bhattacharya *et al.*, 2005; Froment *et al.*, 2006; Corton *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2011) (Figura 5). Inoltre, il recettore PPAR $\gamma$ , è stato di recente identificato nello spermatozoo eiaculato umano, dove regola il metabolismo lipidico a livello sistemico e la cui attivazione induce il fenomeno della capacitazione (Aquila *et al.*, 2006).



**Figura 5:** Analisi mediante *Real-time* PCR dei livelli d'espressione dei trascritti PPAR $\alpha$ ; PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$  in cellule germinali di topo (da Thomas *et al.*, 2011).

Numerosi geni contengono sequenze PPRE nelle regioni di regolazione, e sono quindi specificamente regolati dai recettori PPAR: principalmente tali geni codificano proteine coinvolte nel metabolismo dei lipidi e dei glucidi, come ad esempio, diversi tipi di apolipoproteine responsabili del trasporto degli acidi grassi nel sangue (Vu-Dac *et al.*, 1994) e la fosfoenolpiruvato carbossichinasi, che presiede la glicerogenesi nel tessuto adiposo (Tontonoz *et al.*, 1995). È stata inoltre dimostrata la presenza di elementi PPRE anche in geni coinvolti nella cancerogenesi; per esempio nel promotore del gene *BRCA1*, coinvolto nel tumore della mammella (Aubry *et al.*, 1997). Questo dimostra il coinvolgimento dei geni PPAR anche nei fenomeni di regolazione della proliferazione cellulare, la cui deregolazione è alla base dei processi di trasformazione neoplastica.

Il recettore PPAR $\alpha$  attiva il catabolismo degli acidi grassi, stimola la gluconeogenesi e la sintesi dei corpi chetonici ed è inoltre coinvolto nel controllo dell'assemblaggio delle lipoproteine. I proliferatori dei perossisomi inducono la replicazione del DNA e la proliferazione degli epatociti in modo PPAR $\alpha$ -dipendente e

L'attivazione del recettore PPAR $\alpha$  evidenzia attività tumorigenica nel fegato dei roditori (Michalik *et al.*, 2004). Il recettore PPAR $\beta/\delta$  è richiesto per lo sviluppo della placenta ed è coinvolto nel metabolismo lipidico. La sua funzione maggiormente studiata è il controllo della proliferazione, del differenziamento e della sopravvivenza cellulare, specialmente nei cheratinociti (Michalik *et al.*, 2002). Un'aumentata espressione del recettore PPAR $\beta/\delta$  è stata dimostrata anche nell'adenocarcinoma dell'endometrio e in linee cellulari di cancro alla mammella (Stephen *et al.*, 2004). Il ruolo del gene *PPARG* è fondamentale nel differenziamento degli adipociti, nell'accumulo dei lipidi nel tessuto adiposo bianco e nella produzione di energia nel tessuto adiposo bruno. Inoltre è coinvolto nel controllo delle reazioni infiammatorie e nel metabolismo del glucosio (Michalik *et al.*, 2004). Anche per il recettore PPAR $\gamma$  si è ipotizzato un ruolo nella progressione del cancro, infatti, agonisti del recettore PPAR $\gamma$  usati nel trattamento del cancro potrebbero avere effetti sul metabolismo lipidico e del glucosio (Michalik *et al.*, 2004). Il gene *PPARG* è espresso in cellule cancerose del testicolo umano e della prostata, dove i suoi ligandi (TZDs o 15d-PGJ2) evidenziano marcati effetti antiproliferativi (Hase *et al.* 2002; Segawa *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2000).

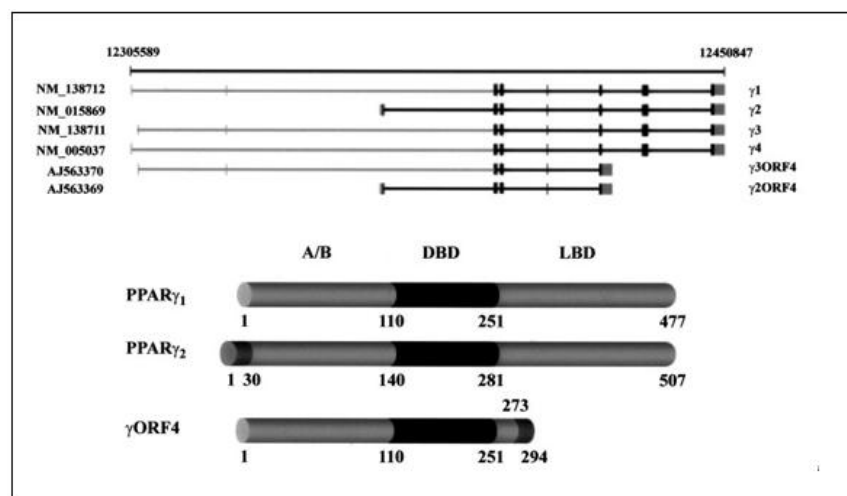
### **1.3 Il gene *PPARG***

#### **1.3.1 Struttura del gene**

Il gene *PPARG* mappa sul cromosoma 3, consta di nove esoni e si estende per più di 100 kb sul DNA genomico (Desvergne and Wahli, 1999).

Nell'uomo sono stati identificati almeno sei trascritti alternativi codificati dal gene *PPARG*:  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\gamma 2$  ORF4,  $\gamma 3$ ORF4. Le isoforme  $\gamma 1$  e  $\gamma 2$ , che differiscono per le estremità al 5' del gene, derivano da un differente uso del promotore e da *splicing*

alternativo. L'isoforma  $\gamma 1$  è codificata da otto esoni e comprende nella regione 5'UTR gli esoni  $A_{1-1}$  e  $A_2$ , mentre  $\gamma 2$  è codificata da sette esoni e differisce dalla forma  $\gamma 1$  per la presenza all'N-terminale dell'esone B; i rimanenti sei esoni sono comuni alle due isoforme (Mukherjee *et al.*, 1997). L'isoforma  $\gamma 3$  contiene nella regione 5' UTR gli esoni  $A_{1-2}$  e  $A_2$  mentre  $\gamma 4$  prevede al 5' la presenza del solo esone  $A_{1-1}$  (Desvergne *and* Wahli, 1999). Le isoforme  $\gamma 1$ ,  $\gamma 3$  e  $\gamma 4$  danno luogo alla stessa proteina di 477 residui amminoacidici, mentre l'isoforma  $\gamma 2$  codifica una proteina con 30 amminoacidi aggiuntivi, codificati dell'esone B (Fajas *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2010). I trascritti,  $\gamma 2$  e  $\gamma 3$  ORF4, generati da uno *splicing* alternativo che provoca la ritenzione di parte dell'introne 4, determinano la produzione di una proteina tronca, in parte sovrapponibile alle isoforme già descritte, ma che possiede 21 amminoacidi diversi al C-terminale dopo quelli codificati dall'esone 4. Tali isoforme, che mancano completamente del dominio di legame al ligando (LBD), agiscono da “dominanti negativi” interferendo con l'attività trascrizionale del recettore  $PPAR\gamma$ , mostrando capacità pro-proliferative e potenzialità oncogeniche (Sabatino *et al.*, 2005) (Figura 6).



**Figura 6:** Struttura delle principali isoforme del recettore  $PPAR\gamma$  (Sabatino *et al.*, 2005).

Il dominio di legame al DNA dei recettori  $\gamma$  è codificato dagli esoni due e tre, ognuno dei quali produce un distinto *zinc finger*; il dominio di legame al ligando è codificato dagli esoni cinque e sei, separati da 16,3 kb di sequenza intronica.

Nel promotore della forma  $\gamma 1$  non è stata identificata una TATA box canonica nelle vicinanze del sito di inizio della trascrizione; la sequenza immediatamente a monte di questo sito è ricca in GC e comprende alcuni siti *consensus* di legame per il fattore di trascrizione Sp1. Il promotore della forma  $\gamma 2$  include un elemento TATA-like in prossimità del sito di inizio della trascrizione (-68) (Desvergne *and* Wahli, 1999).

### 1.3.2 Espressione e funzioni del gene

Il gene *PPARG* è fortemente espresso nel tessuto adiposo e nel colon; minori livelli di espressione si riportano nel fegato e nel rene, mentre il muscolo scheletrico contiene piccole quantità del gene. Nel tessuto adiposo e nel fegato all'incirca il 15% dell'mRNA del recettore PPAR $\gamma$  deriva dall'isoforma  $\gamma 2$ , mentre l'isoforma dominante nel muscolo scheletrico umano è  $\gamma 1$  (Desvergne *and* Wahli, 1999; Michalik *et al.*, 2004). La regolazione dell'espressione di questo gene è stata ben studiata nell'adipogenesi poiché *PPARG* è un cosiddetto “*master gene*” in questo processo, e codifica inoltre un recettore nucleare per farmaci insulino-sensibili (Rousseau *et al.*, 1997). Il ruolo chiave che tale gene riveste nel processo adipogenico ha suggerito che esso possa avere un coinvolgimento in patologie correlate al differenziamento degli adipociti e al metabolismo energetico corporeo, tra cui obesità e diabete (Rousseau *et al.*, 1997). Il ruolo che svolge il gene *PPARG* in questo tipo di patologia è stato dimostrato anche dall'efficacia dei suoi ligandi TZD nel migliorare la resistenza insulinica (Barroso *et al.*, 1999; Rieusset *et al.*, 1999).



Il gene *PPARG* è espresso in tessuti in cui il metabolismo del glucosio è stimolato dall'insulina, tale ormone è espresso e secreto anche dagli spermatozoi umani, dov'è localizzato a livello subacrosomiale, nella zona intermedia e in tutta la coda (Andò *and* Aquila, 2005; Aquila *et al.*, 2005). Il recettore PPAR $\gamma$  nello spermatozoo umano è presente sia a livello di mRNA che di proteina. I risultati dello studio condotto da Aquila e colleghi hanno dimostrato che il recettore PPAR $\gamma$  è capace di indurre la capacitazione (processo che rende lo spermatozoo responsivo agli stimoli che inducono la reazione acrosomiale prima della fecondazione dell'ovocita) e di stimolare il metabolismo lipidico. Infatti, durante la capacitazione la richiesta energetica è maggiore e ciò implica un aumento delle attività metaboliche: attraverso l'attivazione del *pathway* PI3K/AKT, il recettore PPAR $\gamma$  è in grado di influenzare il metabolismo energetico dello spermatozoo eiaculato (Aquila *et al.*, 2006).

I ligandi del recettore PPAR $\gamma$ , tra cui gli eicosanoidi, sono coinvolti anche in processi infiammatori (Ricote *et al.*, 1998; Tontonoz *et al.*, 1998) e possono sopprimere, sia *in vitro* che *in vivo*, la crescita di cellule tumorali (Elstner *et al.*, 1998).

Nelle cellule di carcinoma mammario il recettore PPAR $\gamma$  è espresso efficacemente ed i TZD inducono variazioni fenotipiche correlate con uno stato meno maligno (Mehta *et al.*, 2000). Inoltre il troglitazone riduce lo sviluppo del tumore in topi nudi che derivano da linee cellulari di cancro della mammella (Elstner *et al.*, 1998).

Nel carcinoma follicolare della tiroide, sono state identificate numerose mutazioni nel gene *PPARG* che determinano una riduzione nell'attività del recettore, mentre delezioni emizigoti sono state identificate nel cancro alla prostata. Tutte queste mutazioni determinano una riduzione dei livelli del recettore PPAR $\gamma$ , indicando che la proteina ha un effetto antitumorale.

Il gene *PPARG* é espresso ad elevati livelli nella mucosa del colon (Mansen *et al.*, 1996). Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che il trattamento di linee cellulari di colon con ligandi sintetici di PPAR $\gamma$  provocano una riduzione della crescita cellulare con un fenotipo meno maligno. Tale fenomeno é stato osservato anche *in vivo*; infatti, la somministrazione di ligandi a topi “nudi” determina una diminuzione della crescita dei tumori derivati da cellule di carcinoma del colon (Sarraf *et al.*, 1998). Inoltre, nel tessuto tumorale di pazienti con adenocarcinoma del colon sono state identificate mutazioni nel gene *PPARG*. Tali mutazioni sono tutte in eterozigosi e determinano la perdita di funzione del recettore PPAR $\gamma$ , suggerendo che esso funga da gene oncosoppressore nel colon (Sarraf *et al.*, 1999).

## **1.4 Recettori degli Estrogeni**

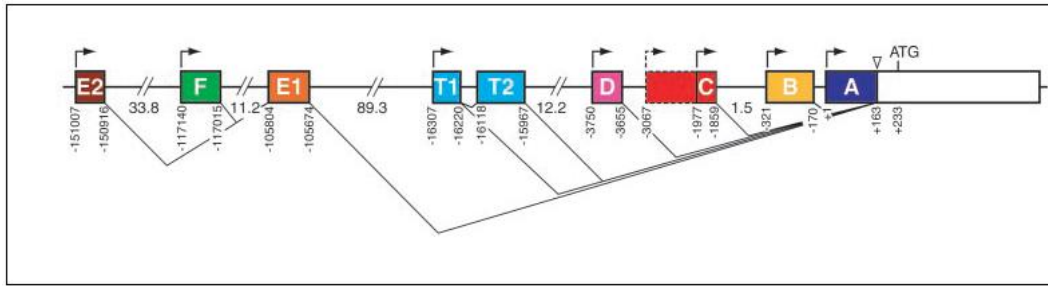
### **1.4.1 Struttura dei geni**

Nel 1896 Thomas Beatson descrive come l'asportazione chirurgica delle ovaie in donne con tumore al seno porti a notevoli miglioramenti della patologia neoplastica rivelando, ancor prima che l'ormone steroideo stesso fosse stato isolato, l'effetto stimolante e pro-proliferativo degli estrogeni (Beatson, 1896). Solo più tardi, studi condotti da Jensen e Jacobson, sul legame specifico del 17  $\beta$ -estradiolo ( $E_2$ ), dimostrarono come l'ormone fosse specificamente trattenuto in alcuni tessuti bersaglio come l'utero, ed ipotizzarono la presenza di un recettore come tramite cellulare capace di mediare e trasdurre gli effetti descritti da Beatson (Jensen *and* Jacobson, 1960; Jensen *and* Jacobson 1962).

Oggi è noto che l'attività degli estrogeni è mediata da due recettori che appartengono alla famiglia dei recettori nucleari per gli ormoni steroidei (Laudet *et al.*,

1992). Nei vertebrati sono state identificate due principali proteine, derivanti da due geni distinti: *ESR1*, che codifica il recettore ER $\alpha$  (NR3A1), mappato sul cromosoma 6 in posizione 6q25.1, ed *ESR2*, localizzato sul cromosoma 14, nella regione 14q23.2, che codifica per la proteina ER $\beta$  (NR3A2) (Gosden *et al.*, 1986; Ponglikitmongkol *et al.*, 1988; Mosselaman *et al.*, 1996; Enmark *et al.*, 1997). Una terza isoforma del recettore degli estrogeni, ER $\gamma$ , originata da una duplicazione del gene ancestrale *ESR2*, è stata identificata nei teleostei, mentre Luconi e colleghi hanno isolato dalle membrane degli spermatozoi umani una proteina capace di mediare effetti non genomici (Hawkins *et al.*, 2000; Luconi *et al.*, 1999).

L'analisi di numerosi membri della famiglia dei recettori nucleari ha indicato come la presenza di più promotori nel gene sia una caratteristica comune dei recettori per gli ormoni sessuali steroidei (Hodin *et al.*, 1989; Kastner *et al.*, 1990). Nell'uomo, infatti, entrambi i geni *ESR1* ed *ESR2* presentano diversi esoni non tradotti (UTR, *UnTranslated Region*) nella regione al 5'. Eventi di *splicing* alternativo o delezione/duplicazione esonica, danno origine a trascritti codificanti diverse isoforme proteiche. Nell'uomo, il gene *ESR1* si estende per 140 kb, ha una regione codificante (ORF, *Open Reading Frames*) composta da otto esoni e codifica per una proteina di 595 residui amminoacidici. La regione al 5' del gene umano è poco conservata tra le diverse specie, per la presenza di nove esoni non codificanti, denominati rispettivamente A, B, C, D, E1, E2, F, T1 e T2, a monte del sito di inizio della trascrizione (esone 1), che include in posizione +163 un sito accettore di *splicing* (Brand *et al.*, 2002; Piva *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1997; Keaveney *et al.*, 1991; Grandien 1996; Flouriot *et al.*, 1998; Kos *et al.*, 2001) (Figura 7).

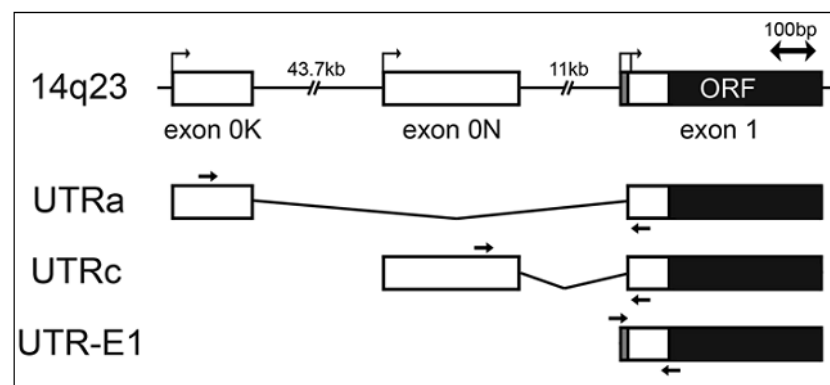


**Figura 7:** Organizzazione genomica della regione promotore del gene umano ER $\alpha$ . Le caselle colorate rappresentano gli esoni a monte del sito di inizio trascrizione, i numeri sotto corrispondono alle distanze dall'ATG. I numeri tra gli esoni mostrano le dimensioni degli introni più grandi in kb. Le linee simboleggiano i differenti *splicing* e il sito accettore di *splicing* nell'esone 1 è rappresentato da un triangolo (Immagine modificata da Kos *et al.*, 2001).

I numerosi codoni d'inizio AUG nei vari 5'UTR ostacolano la scansione dei ribosomi verso il sito di inizio della traduzione canonico, che codifica per la forma più lunga della proteina (Kos *et al.*, 2001); in linea di massima il gene viene trascritto da almeno sette promotori, ma è plausibile che possano esistere altri esoni non ancora identificati ed utilizzati solo in particolari tessuti o tipi cellulari. Tra i diversi promotori, l'esone A è il più utilizzato ed è quello maggiormente espresso, sia in linee cellulari normali che tumorali (Grandien *et al.*, 1993; Grandien *et al.*, 1995), seguito dai promotori B e C, prevalentemente utilizzati nei tessuti che esprimono livelli relativamente alti del recettore ER $\alpha$  (mammella, utero, cervice). I promotori più distali, chiamati E ed F, sono adoperati nei tessuti in cui il recettore ER $\alpha$  è meno abbondante, come il fegato e gli osteoblasti (Reid *et al.*, 2002; Flouriot *et al.*, 1998), mentre T1 e T2, sono espressi prevalentemente nel testicolo e nell'epididimo (Brand *et al.*, 2002). La presenza di tutti questi promotori potrebbe essere spiegata con la necessità fisiologica di esprimere trascritti differenti in differenti tessuti ed in diversi stadi di sviluppo, poiché le isoforme proteiche sono state individuate in distretti eterogenei come il seno, l'endometrio, le cellule muscolari lisce e le cellule mononucleari del sangue periferico (Petursdottir *et al.*, 2001; Rice *et al.*, 1997). Tuttavia, il trascritto primario conduce

spesso anche alla sintesi di varianti proteiche prive di uno o più esoni (*exon-skipping*), spesso associate alla progressione di diversi tipi di tumori, come il cancro della mammella. Sembra che ci sia una particolare affinità nel sito di *splicing* tra l'esone 3 (-5' sito donatore di *splicing*) e l'esone 5 (-3' sito accettore di *splicing*), responsabile dello *skipping* dell'esone 4: infatti, il trascritto nel quale vi è la non inclusione dell'esone 4, codificante l'isoforma proteica ER $\alpha$  $\Delta$ 4, è il più frequente, ed è quella più espressa nella linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7. L'esone 6, che non è mai deletato in cellule MCF-7, se inserito tra gli esoni 3 e 5, subisce un evento di *skipping* (Ferro *et al.*, 2003). Tuttavia, nella stragrande maggioranza dei casi, la forma *wild-type* del recettore ER $\alpha$  è sempre co-espressa con le sue varianti proteiche (Anandappa *et al.*, 2000).

Il gene *ESR2* nell'uomo si estende per circa 61,2 kb, ed è costituito da otto esoni che codificano una proteina di 530 amminoacidi. La regione 5' UTR è composta da tre esoni, denominati "0N", "0K" ed "E-1", quest'ultimo recentemente identificato (Smith *et al.*, 2010) (Figura 8).



**Figura 8:** Organizzazione genomica della regione promotore del gene umano *ESR2*. I tre promotori (0K, 0N ed E1), guidano l'espressione del trascritto *full-length* dell'mRNA del recettore ER $\beta$ . Ciascun promotore produce trascritti con le estremità 5'UTR differenti, chiamate rispettivamente UTRa, UTRc ed UTR-E1 (Smith *et al.*, 2010).

Il clonaggio dei tre esoni 5' UTR ha consentito di dimostrare che l'esone "0N" è il più attivo dal punto di vista trascrizionale ed è espresso in un gran numero di cellule e tessuti, sia normali che tumorali (Li *et al.*, 2000). I trascritti del gene *ESR2* contenenti l'esone UTR "0N" sono espressi negli spermatozoi, nell'endometrio e nel miometrio uterino, oltre che in cellule di cancro al seno, alle ovaie ed alla prostata (Zhao *et al.*, 2003).

Trascritti contenenti l'esone "0K" sono principalmente espressi negli spermatozoi (Hirata *et al.*, 2001), nel fegato e nell'endometrio, e le sequenze genomiche a valle di tale esone - comprese tra la posizione nucleotidica -534 e -1058 - sembrano contenere siti di legame per fattori di trascrizione che regolano l'espressione basale del recettore ER $\beta$ . Infine, l'esone UTR "E-1", è trascritto sia in cellule normali che tumorali di carcinoma mammario (MCF7; HB2). Le numerose varianti di *splicing* del recettore ER $\beta$ , descritte più avanti, sembrano avere la funzione di regolare il *pool* di mRNA disponibili per la produzione della proteina *full-length*, al fine di controllare in maniera tessuto-specifica i livelli di espressione del recettore stesso (Murphy *et al.*, 1998; Poola *et al.*, 2002).

Come tutti i membri della superfamiglia dei recettori nucleari, le proteine ER $\alpha$  ed ER $\beta$  mostrano una struttura modulare suddivisa in cinque domini funzionali:

- il primo esone codifica per il dominio A/B nella regione N-terminale;
- due esoni (2-3) sono necessari per il dominio C di legame al DNA, codificato in parte anche dell'esone 4 (Gly-254 a Gly-262). Quest'ultimo esone evidenzia una natura "a mosaico", poiché codifica anche tutta la regione D (Arg-263 a Ser-301) e parte del dominio E (Lys-302 a Pro-365);

- infine cinque esoni (4-8) codificano per il dominio E di legame al ligando e parte dell'esone 8 codifica per il dominio F (Ponglikitmongkal *et al.*, 1998).

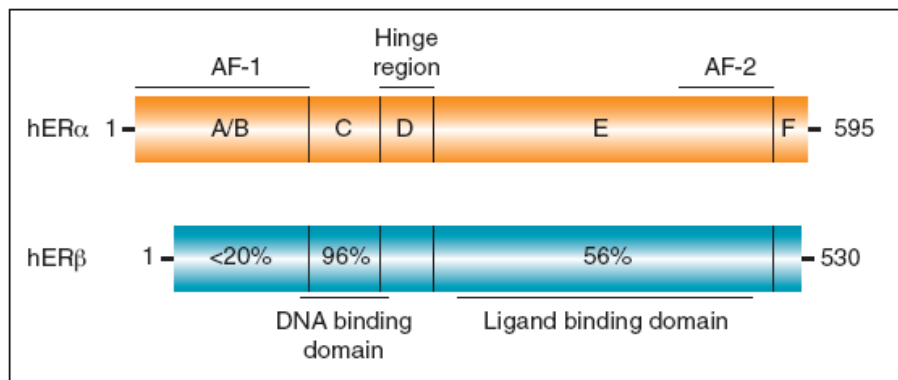
La porzione N-terminale, o il dominio A/B, è la più variabile (meno del 20% di identità amminoacidica) e sembra possa contribuire alla specificità di azione gene-specifica dei recettori ER; le differenze in questa regione possono essersi verificate a seguito della duplicazione del gene ancestrale, o per una forte divergenza avvenuta durante l'evoluzione (Tora *et al.*, 1989). All'interno di questo dominio si trova il motivo AF-1, coinvolto nelle interazioni proteina-proteina e nell'attivazione trascrizionale ligando-indipendente attivata da fattori di crescita come EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF (*Insulin-like Growth Factor*), TGF  $\alpha$  (*Transforming Growth Factor  $\alpha$* ), (Weigel *et al.*, 1998; Bunone *et al.*, 1996; Aronica *et al.*, 1993; Tzukerman *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 1987; Berry *et al.*, 1990; Metzger *et al.*, 1995). Inoltre, questa regione contiene un dominio capace di legare diversi coattivatori, come p68 e SRC-1, e co-repressori, come Ssn3 (McDonnell *et al.*, 1992; Onate *et al.*, 1995).

La sequenza amminoacidica del dominio di legame al DNA (DBD) è altamente conservata tra i due recettori, che mostrano circa il 96% di identità. In particolare, la sequenza P-box (*Proximal box*), importante per il riconoscimento della sequenza sul DNA, è la stessa (Klein-Hitpass *et al.*, 1988; Tzukerman *et al.*, 1994).

Il dominio strutturale D è una regione poco conservata tra ER $\alpha$  e ER $\beta$  (30%), e contiene parte del dominio di attivazione AF-2 ligando-dipendente e parte del segnale di localizzazione nucleare (Picard *et al.*, 1990).

Infine, la regione C-terminale, che mostra circa il 58% di identità tra i due sottotipi, comprende i domini E ed F di legame al ligando (LDB) e di transattivazione AF-2, capace di legare co-attivatori come SRC-1/2/3 e CBP (*CREB binding protein*), e

corepressori come TRIP1 (*Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 1*) e REA (*Repressor of Estrogen Activity*) (McDonnell *et al.*, 1992; Voegel *et al.*, 1998; Onate *et al.*, 1998). È stata inoltre ipotizzata la presenza di un terzo dominio di transattivazione, chiamato AF-2a, anch'esso collocato nell'LBD, con attività ligando-dipendente simile ad AF-2 (Norris *et al.*, 1997) (Figura 9).



**Figura 9:** Rappresentazione schematica dei domini strutturali del recettore degli estrogeni ER $\alpha$  ed ER $\beta$ . Le percentuali rappresentano l'identità aminoacidica delle diverse regioni funzionali, i domini A/B e D non sono ben conservati. (Raymond Lo and Jason Matthews, 2010).

L'azione degli ormoni steroidei si esplica, dal punto di vista molecolare, attraverso il legame dei recettori degli estrogeni a specifiche sequenze *consensus* localizzate nelle regioni regolatorie dei geni bersaglio, definite *Estrogen Responsive Elements* (ERE) ed identificate per la prima volta nel gene codificante la vitellogenina in *Xenopus* (Klein-Hitpass *et al.*, 1986).

Il motivo ERE è costituito da sequenze palindrome, ossia ripetute in modo invertito e speculare rispetto ad un'asse di simmetria. La sequenza consenso è 5'-GGTCAnnnTGACC-3' ed il numero di nucleotidi che separa le due sequenze è  $n=3$ ; tale numero determina l'efficienza del legame al DNA, in accordo con le sequenze fiancheggianti, capaci anch'esse di conferire un'interazione più stabile (Anolik *et al.*, 1996). Tuttavia, esistono anche numerose ERE che divergono da questa sequenza



consenso, ampliando, pertanto, il numero dei possibili *pathway* genici regolati da questi recettori (Klein-Hitpass *et al.*, 1988; Klock *et al.*, 1987; Driscoll *et al.*, 1998; O'Lone *et al.*, 2004). È interessante notare come solo il 4% delle sequenze ERE sia localizzata ad 1kb dalla regione prossimale del promotore dei geni bersaglio, e che spesso la Polimerasi II sia già reclutata presso i promotori di molti geni non espressi, ancor prima dell'attivazione (Barski *et al.*, 2007; Kininis *et al.*, 2007; Guenther *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005; Radonjić *et al.*, 2005).

Generalmente i recettori per gli ormoni steroidei, come i gluco- e mineral-corticoidi, il recettore per gli androgeni, e la forma B del recettore del progesterone, mostrano una distribuzione citoplasmatica in assenza di ligando (Yoshida *et al.*, 2002; Htun *et al.*, 1996; Fejes-Toth *et al.*, 1998); i recettori ER, al contrario, sono proteine con una distribuzione principalmente nucleare, sia in presenza che in assenza del ligando (Dauvois *et al.*, 1993; Parker, 1993; Matsuda *et al.*, 2002). Questo è dato dalla presenza di proto-segnali di localizzazione nucleare (p-NLS) ligando-inducibili, che collaborano, in presenza dell'ormone E<sub>2</sub> e dei ligandi agonisti, con i segnali costitutivi di localizzazione nucleare (motivi ricchi in lisina/arginina) collocati nell'LBD (Ylikomi *et al.*, 1992).

Comparando il sito di legame dell'ormone nei recettori degli estrogeni con quello di altri recettori nucleari, si è osservato che esso presenta una cavità più ampia, spiegando la capacità delle proteine ER di legare, oltre al ligando naturale, un'ampia gamma di composti con strutture chimiche differenti (Pettersson *and* Gustafsson, 2001). Infatti, sebbene ER $\alpha$  e ER $\beta$  leghino entrambi l'estradiolo, ed in generale altri ligandi fisiologici con affinità simile, esistono delle differenze nella capacità individuale di ciascun recettore nel legare altri ligandi e nel determinare effetti di agonismo/antagonismo sulla trascrizione genica. Le diverse proprietà di trans-

attivazione e di legame mostrate dai due recettori nucleari sono state utilizzate a scopo terapeutico, attraverso lo sviluppo di modulatori selettivi per i recettori degli estrogeni (SERM, *Selective Estrogen Receptor Modulators*), ovvero di composti di sintesi (non steroidei) ad attività anti-estrogenica che impediscono il legame dell'ormone al proprio recettore. Il Tamoxifen, un anti-estrogeno, è infatti utilizzato nella terapia endocrina per il cancro al seno. Tuttavia, l'effetto antagonista, dovuto alla capacità di reclutare co-repressori trascrizionali come NCoR e SMRT, sembra esclusivo per il sottotipo ER $\alpha$  (Jackson *et al.*, 1997). Al contrario, il recettore ER $\beta$ , che mostra una "tasca" per il legame con il ligando più piccola (~ 20%), recluta questo stesso tipo di co-repressori in presenza di agonisti, ma non di antagonisti (Brzozowski *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 2003). Inoltre, una ridotta espressione di NCoR e SMRT è stata correlata con la resistenza al Tamoxifen nei tumori della mammella (Lavinsky *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2000). Nel ratto, l'ormone 17 $\alpha$ -estradiolo ha un'affinità cinque volte maggiore per il recettore ER $\alpha$ , mentre la genisteina, isoflavone della classe dei fitoestrogeni dotati di azione estrogenica, mostra *in vitro* un'affinità maggiore per la proteina ER $\beta$  (Kuiper *et al.*, 1998).

### 1.4.2 Espressione e funzione dei geni

L'ormone steroideo 17 $\beta$ -estradiolo, principalmente sintetizzato dalle ovaie e dai testicoli, è un regolatore chiave per la crescita, il differenziamento, lo sviluppo sessuale ed altre importanti funzioni in molti tessuti bersaglio, come il tratto riproduttivo femminile e maschile (utero, ovaie, testicoli e prostata), la ghiandola mammaria, il sistema scheletrico ed il sistema cardiovascolare (Clark *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 2001).

Gli estrogeni esercitano effetti positivi sullo sviluppo e sul mantenimento dello scheletro, effetti tra i quali il controllo della crescita, la maturazione ed il mantenimento

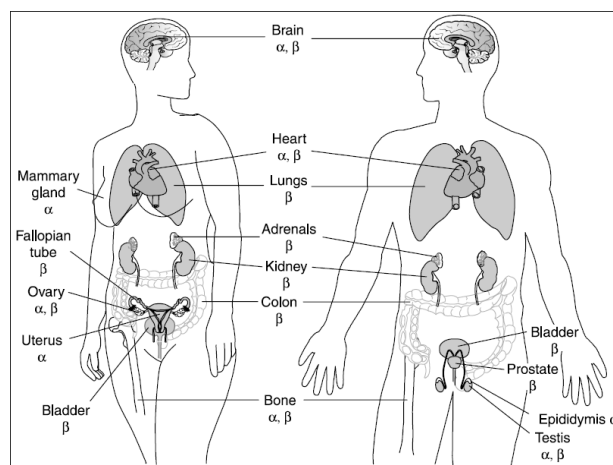
della massa ossea (Prince, 1994; Compston; 2001; Turner *et al.*, 1994). Entrambe le proteine ER sono espresse negli osteoblasti, negli osteoclasti e nelle cellule stromali del midollo osseo (Bland, 2000) e co-localizzano nell'osso adulto: la proteina ER $\beta$  è la più espressa nell'osso trabecolare (Onoe *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1999), mentre il recettore ER $\alpha$  predomina in quello corticale e sembra essere il principale recettore per la regolazione del *turnover* osseo (Bord *et al.*, 2001).

*In vitro*, l'ormone 17 $\beta$ -estradiolo, è in grado di aumentare la proliferazione dei pre-adipociti e di regolare fisiologicamente la distribuzione del tessuto adiposo: donne in menopausa manifestano un aumento nel deposito di grasso nella regione addominale, che si riduce con la terapia estrogenica sostitutiva (Anderson *et al.*, 2001). Negli adipociti maturi si ritrovano entrambi i recettori, con una maggiore predominanza dell'isoforma  $\alpha$ , rispetto ai livelli dell'isoforma  $\beta$ , più espressa nelle donne rispetto agli uomini (Dieudonne *et al.*, 2004; Anwar *et al.*, 2001; Casabiell *et al.*, 1998).

In numerosi tessuti, tra cui la ghiandola mammaria, il fegato, l'epididimo, la tiroide ed il tessuto osseo, i recettori ER $\alpha$  ed ER $\beta$  formano omo- o etero-dimeri (Pettersson *et al.* 1997; Couse *et al.*, 1997; Shughrue *et al.*, 1998; Jarvinen *et al.*, 2000; Saji *et al.*, 2001; Cowley *et al.*, 1997; Pettersson *et al.*, 2000). Ad esempio, nell'ipotalamo, i recettori ER $\alpha$  e ER $\beta$  sembrano essere presenti in uno stesso neurone dove possono eterodimerizzare (Pettersson *et al.*, 1997).

In alcuni tessuti la diversa distribuzione dei due recettori suggerisce funzioni biologiche distinte: il gene *ESR1*, principalmente coinvolto negli eventi riproduttivi, è il recettore più abbondante nella mammella, nell'ovaio, nell'utero, nella cervice, nella vagina, nella prostata, nella vescica, oltre che nello stomaco e nell'apparato cardiovascolare (Grohe *et al.*, 1997, Kuiper *et al.*, 1997, Drummond *et al.*, 1999, Pelletier *et al.*, 2000, Bord *et al.*, 2001, Morani *et al.*, 2008).

Il gene *ESR2* è espresso preferenzialmente, come vedremo in seguito, nel tratto urogenitale maschile (Hess *et al.*, 1997), dove l'isoforma alpha è molto meno pronunciata (Gustafsson *et al.*, 1999). Il recettore ER $\beta$  è localizzato anche nelle ovaie, nelle tube di Falloppio, colon, polmone, tessuto adiposo, rene, surrene, ossa, cuore e vescica (Enmark *et al.* 1997, Grohe *et al.* 1997, Kuiper *et al.* 1997, Taylor and Al-Azzawi 2000, Anwar *et al.*, 2001, Bord *et al.*, 2001, Morani *et al.*, 2008). Nel sistema nervoso centrale (SNC), il recettore ER $\beta$  è localizzato nel lobo olfattivo, nella corteccia, nel cervelletto e nell'ippocampo, ed è principalmente espresso nelle aree coinvolte nell'apprendimento e nella memoria (Shughrue *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998; Weiser *et al.*, 2008) (Figura 10). Nel ratto, il recettore ER $\alpha$  è maggiormente espresso nell'epididimo, nell'ipofisi, utero, reni e surreni, con una lieve espressione nel talamo e nell'ipotalamo, mentre elevati livelli della proteina ER $\beta$  sono stati identificati nella prostata, nel testicolo, nelle ovaie (cellule della granulosa), utero, vescica e polmone, con una moderata espressione nella ghiandola pituitaria, epididimo, timo, cervello e midollo spinale (Kuiper *et al.*, 1997).



**Figura 10:** Distribuzione dei recettori ER nei diversi tessuti umani (Drummond and Fuller, 2010).

Gli estrogeni sono considerati un forte fattore di rischio per l'iniziazione e la progressione di diversi tumori endocrino-correlati (ad esempio, cancro al seno, alle ovaie, alla prostata e al testicolo) (Russo *and* Russo 1998; Di Leo *et al.* 2001; Pujol *et al.*, 1998; Deroo *and* Korach, 2006). Recenti studi indicano come, dopo breve trattamento ormonale con E<sub>2</sub> (1-8h) i geni *target* degli estrogeni siano *up*-regolati, mentre risultino generalmente *down*-regolati a seguito di lunghe esposizioni con l'ormone (12-48h) (Frasor *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004).

Generalmente, il recettore ER $\alpha$  è in grado di promuovere le vie di segnale proliferative (ERK/MAPK, PI3K/Akt) e l'entrata nel ciclo cellulare (Hall *and* McDonnell, 1999), mentre, in presenza del recettore ER $\beta$ , l'ormone E<sub>2</sub> induce la morte cellulare attraverso l'attivazione della proteina p38/MAPK (*p38 Mitogen-Activated Protein Kinase*), responsabile a sua volta dell'attivazione della caspasi-3 e del taglio proteolitico di PARP (*Poli ADP-Ribosio Polimerasi*), i principali effettori molecolari del processo apoptotico (Acconcia *et al.*, 2005; Marino *and* Ascenzi, 2008; Acconcia *and* Marino, 2011). L'attività antiproliferativa e pro-apoptotica del recettore ER $\beta$  si esplica generalmente attraverso l'eterodimerizzazione con l'isoforma ER $\alpha$ : infatti, mediante l'eterodimerizzazione dei recettori, la cellula è capace di limitare la risposta a segnali non-estrogenici frenando la segnalazione mediata dai fattori di crescita attraverso la proteina ER $\alpha$ . Segnalazioni estrogeniche aberranti sono inoltre associate a diverse malattie umane come la schizofrenia, il Parkinson (Cyr *et al.*, 2002) e l'osteoporosi (Gennari *et al.* 2002; Grumbach, 2000).

## 1.5 Il gene *ESR2*

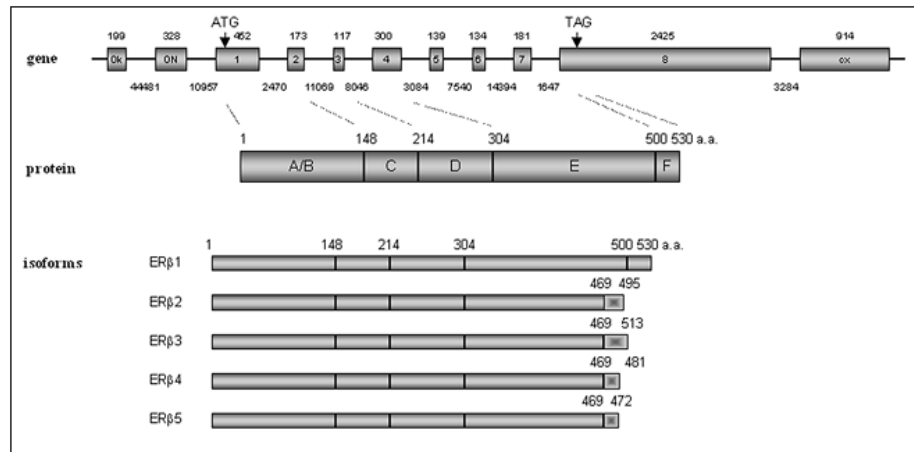
### 1.5.1 Struttura del gene

Il clonaggio nel 1996 di un secondo recettore per gli estrogeni, ER $\beta$ , da una libreria di cDNA di prostata di ratto (Kuiper *et al.*, 1996), ha ridefinito ed ampliato la conoscenza alla base dei meccanismi di segnalazione cellulare estrogeno-mediata.

Nell'uomo, la regione codificante del gene è costituita da otto esoni, che codificano una proteina di 530 aminoacidi, chiamata hER $\beta$ 1; invece, sia nel topo che nel ratto, il gene codifica una proteina più grande, di 549 residui amminoacidici (Lu *et al.*, 1998).

Ad oggi, sono state descritte numerose isoforme del sottotipo ER $\beta$  (Chu *and* Fuller, 1997; Chu *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 1998, Poola *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2005, 2008). Un'isoforma contenente 18 aminoacidi in più (dovuti ad un'inserzione di 54 nucleotidi nel dominio di legame al ligando), definita ER $\beta$ 2, è presente solo nei roditori (Chu *and* Fuller 1997, Lu *et al.*, 1998), ed agisce come dominante negativo sulla trascrizione mediata dai recettori ER $\beta$  ed ER $\alpha$  (Maruyama *et al.*, 1998).

Nell'uomo, l'ottavo esone ha diverse forme alternative, e la sua inclusione nel trascritto maturo determina l'esistenza di diverse isoforme: hER $\beta$ 2, anche nota come hER $\beta$ cx, hER $\beta$ 3, hER $\beta$ 4 ed hER $\beta$ 5. I trascritti hER $\beta$ 1-5 mostrano un'identica sequenza nucleotidica dall'esone 1 fino all'esone 7, ma divergono tutti nella regione 3' (C-terminale considerando la proteina), a partire dalla posizione +469, corrispondente all'elica 10 dell'LBD (Ogawa *et al.*, 1998, Inoue *et al.*, 2000, Poola *et al.*, 2005; Lewandowski *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 1998). Delle isoforme umane, ER $\beta$ 1 è l'unica che ha mostrato una piena attivazione funzionale, mentre gli omodimeri ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 4 e ER $\beta$ 5 non hanno attività biologica trascrizionale, ma possono lo stesso eterodimerizzare con il recettore ER $\beta$ 1 per migliorare la sua attivazione (Leung *et al.*, 2006) (Figura 11).



**Figura 11:** Isoforme principali del gene *ERS2* presenti nell'uomo (Zhao *et al.*, 2008).

I recettori ERβ1 ed ERβ2 sono le isoforme principalmente studiate poiché agiscono come repressori della funzione del recettore ERα, mediante un arresto della crescita nei tumori ormono-dipendenti. L'isoforma ERβ2 codifica una proteina di 495 residui aminoacidi, e nell'estremità C-terminale gli aminoacidi codificati dall'esone 8 sono sostituiti da 26 amminoacidi unici, abolendo la funzione di transattivazione AF-2 e determinando una ridotta affinità per l'estradiolo o per altri ligandi (Ogawa *et al.*, 1998). Tale proteina presenta inoltre una ridotta, se non nulla, capacità di legare il DNA, benché mantenga inalterata la capacità di inibire la trascrizione del recettore ERα; tale effetto antagonista sembra essere correlato all'induzione, da parte dell'eterodimero ERβ2/ERα, verso la degradazione proteasomale (Ogawa *et al.*, 1998, Peng *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 1998).

L'espressione del recettore ERβ3 sembra essere limitata al solo testicolo (Moore *et al.*, 1998), ma non sono ancora stati eseguiti studi funzionali. Le varianti ERβ1-3 sono capaci di formare omo- ed eterodimeri tra loro e con il sottotipo ERα, mentre le isoforme ERβ4 e ERβ5, originariamente descritte come proteine tronche (Moore *et al.*, 1998), possono invece eterodimerizzare solo con il recettore ERβ1 e migliorarne la capacità di trans-attivazione ligando-dipendente (Leung *et al.*, 2006).

L'elevato numero di isoforme proteiche del recettore ER $\beta$ 1 deriva anche da meccanismi di “*exon-skipping*”, in cui la delezione di uno o più esoni dal pre-mRNA, genera numerose varianti come hER $\beta\Delta$ 2, hER $\beta\Delta$ 3, hER $\beta\Delta$ 4, hER $\beta\Delta$ 5, hER $\beta\Delta$ 6, hER $\beta\Delta$ 2,6, hER $\beta\Delta$ 2,3,6, hER $\beta\Delta$ 5,6, hER $\beta$ 2 $\Delta$ 5, hER $\beta$ 5 $\Delta$ 2,5,6 (Hirata *et al.*, 2003; Hirata *et al.*, 2002; Lewandowski *et al.*, 2002, Springwald *et al.*, 2010). Tra queste, la variante ER $\beta\Delta$ 7 è quella più spesso osservata nel carcinoma mammario umano, l'isoforma ER $\beta\Delta$ 3, perde la capacità di legare il DNA e quindi di mediare i segnali estrogenici, mentre la proteina ER $\beta\Delta$ 5, nella quale vi è la perdita di 139 coppie di basi corrispondenti all'intero esone 5 (che codifica l'LBD), non ha alcun effetto differenziale sull'attivazione basale di ER $\beta$  ma agisce da dominante negativo sulla funzione dei recettori ER $\beta$ 1 ed ER $\alpha$ , contribuendo alla genesi di tumori estrogeno-indipendenti (Price *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2000).

### 1.5.2 Espressione e funzioni del gene

Molti dei processi fisiologici nell'uomo, quali lo sviluppo puberale e la funzione riproduttiva, sono strettamente regolati dagli estrogeni, che mostrano effetti positivi particolarmente rilevanti sulla spermatogenesi e sulla spermioistogenesi. Il testicolo è in grado di sintetizzare estrogeni dal periodo fetale e per tutta l'età adulta, e l'enzima deputato alla loro sintesi, la P450 aromatasi, è espresso sia a livello del testicolo che dell'epididimo: topi *knockout* per il gene che codifica l'aromatasi evidenziano una spermatogenesi progressivamente alterata con difetti negli spermatidi, disturbi nella formazione acrosomiale e apoptosi (Carreau, *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 1999).

Nei gonociti dei roditori, nei quali la proliferazione è indotta dal 17 $\beta$ -estradiolo (Li *et al.* 1997), la riduzione dei livelli di E<sub>2</sub> inibisce la maturazione degli spermatidi, sebbene una loro eccessiva esposizione in utero, o neonatale, comporti gravi difetti

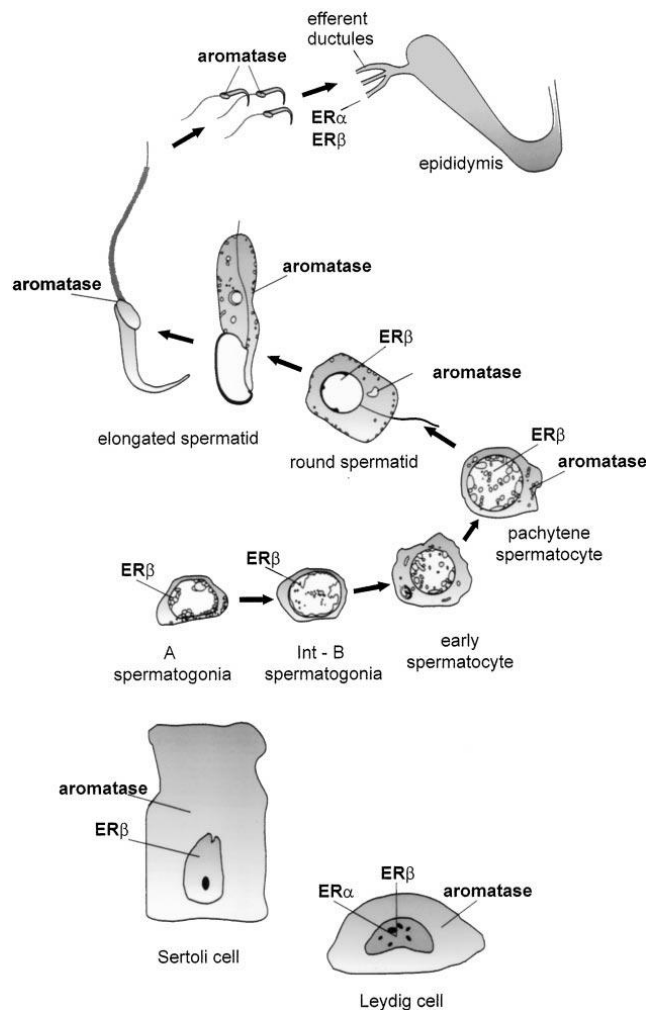


nell'apparato riproduttivo, alterazioni della spermatogenesi e cancro testicolare (Tekmal *et al.*, 1996; Huseby, 1976; Bosland, 1996; Kirma *et al.*, 1999; Tsutsumi *et al.*, 1987; Eddy *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1999).

Il gene *ESR2* è espresso nei testicoli di diverse specie in tutte le età (Aquila *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009; Rago *et al.*, 2007; Couse *et al.* 1997; Abney, 1999; Goyal *et al.*, 1997; Pelletier *et al.*, 1999; McKinnell *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2001, Nie *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Gaskell *et al.* 2003; Hejmej *et al.*, 2005; Mutembei *et al.*, 2005; Shapiro *et al.* 2005; Berensztein *et al.*, 2006; Ramesh *et al.*, 2007; Gist *et al.*, 2007) e risulta, insieme al recettore ER $\beta$ 2, la forma predominante nel tratto riproduttivo maschile e quella maggiormente espressa nelle cellule germinali primordiali (Aschim *et al.*, 2004; Saunders *et al.*, 2002, 1998; Pelletier *et al.* 2000; Sharpe, 1998; Hess *et al.*, 2001, 2003; Enmark *et al.*, 1997; Takeyama *et al.*, 2001; Gaskell *et al.*, 2003).

Nel lavoro sull'immunolocalizzazione dei recettori degli estrogeni nei testicoli maturi ed immaturi di maiale, Rago e collaboratori (Rago *et al.*, 2007) hanno evidenziato la proteina ER $\alpha$  espressa unicamente nei testicoli maturi, mentre il recettore ER $\beta$ , è stato identificato sia nelle gonadi immature (cellule di Leydig e spermatogoni), che nei testicoli adulti (spermatogoni e spermatociti).

In generale, gli spermatogoni sono sempre positivi per la presenza del recettore ER $\beta$  in tutte le fasi della spermatogenesi: nel topo il gene *ESR2* è espresso anche nelle cellule di Leydig, oltre che negli spermatogoni e negli spermatidi (Rosenfeld *et al.*, 1998; Jefferson 2000), mentre nel ratto la proteina ER $\beta$  è presente nelle cellule di Sertoli, negli spermatogoni di tipo A, negli spermatociti in pachitene e negli spermatidi rotondi (Saunders *et al.*, 1998; Van Pelt *et al.*, 1999; Gustafsson, 1999) (Figura 12).



**Figura 12:** Localizzazione dei recettori ERα, ERβ e dell'enzima aromatasi. La produzione degli estrogeni, per opera dell'enzima aromatasi, avviene nelle cellule somatiche e nelle cellule germinali a partire da spermatociti in pachitene fino allo stadio di spermatidi rotondi. I due recettori mostrano un diverso *pattern* di espressione cellulare, con una prevalente distribuzione del recettore ERα nelle cellule di Leydig e della proteina ERβ nelle cellule di Sertoli e/o nelle cellule germinali (O'Donnel *et al.*, 2001).

In un recente lavoro, Bourdeau e collaboratori, hanno individuato oltre 70.000 sequenze ERE nel genoma umano (Bourdeau *et al.*, 2004), anche se il numero dei geni modulati dagli E<sub>2</sub> è compreso in un *range* tra i ~100 a ~1.500 (Kininis and Kraus 2008; Stender *et al.*, 2007). Non sorprende, in questo studio, il ritrovamento di numerose sequenze ERE, conservate tra uomo e topo, in geni legati alla funzione testicolare, come il gene *TESK1* (*TEstis-Specific protein Kinase 1*) espresso nelle cellule germinali del testicolo, importante durante la meiosi e l'inizio della spermiogenesi (Toshima *et al.*,

1995, 1998), *KHDRBS3* (*KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3*), omologo del gene *SAM68*, espresso soprattutto nel testicolo dove interagisce con una proteina RBM (*RNA-binding motif*), coinvolta anch'essa nella spermatogenesi (Venables *et al.*, 1999), e il fattore di crescita dei fibroblasti 9 (FGF-9, *Fibroblast Growth Factor*), che media l'azione proliferativa degli estrogeni sulle cellule stromali endometriali (Tsai *et al.*, 2002) e che svolge un ruolo nell'embriogenesi testicolare: nel topo, infatti, la sua inattivazione porta ad un'inversione sessuale maschio-femmina (Colvin *et al.*, 2001). Anche *FGF8* (*Fibroblast Growth Factor 8*), un gene indotto dagli androgeni, contiene sequenze ERE ed è espresso nei testicoli (Valve *et al.*, 1997) infine, *RNF14* (*Ring Finger Protein 14* o *ARA54*), un co-attivatore, è espresso nei testicoli e nella prostata (Kang *et al.*, 1999).

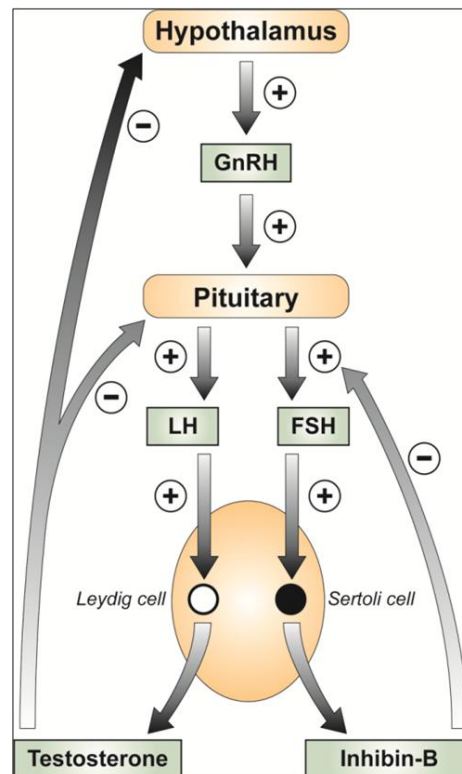
I geni in cui sono localizzate sequenze ERE sono inoltre coinvolti in processi di regolazione trascrizionale, proliferazione cellulare, trasformazione e apoptosi (Frasor *et al.*, 2003). La regolazione mediata del recettore ER $\beta$  sulla proliferazione cellulare e l'effetto citoprotettivo nello sviluppo del tumore è correlata alla capacità di bloccare la crescita delle cellule attraverso meccanismi quali differenziamento, apoptosi e modulazione di geni che codificano per proteine implicate nella regolazione dei *check-points* del ciclo cellulare (Hayashido *et al.* 1998; Bardin *et al.*, 2004; Vendrell *et al.* 2004; Treeck *et al.* 2007). L'ipermetilazione delle isole CpG gioca un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione di vari tipi di tumori (Dulaimi *et al.*, 2004; Umetani *et al.*, 2005). L'identificazione di promotori ipermetilati è infatti un efficace approccio per l'individuazione di numerosi geni correlati al cancro, come i geni soppressori di tumore (Herman and Baylin, 2003). Anche il promotore del gene *ERS2* è ipermetilato in diversi tipi di tumori, come il cancro al seno e alla prostata, dove la sua trascrizione è notevolmente ridotta. L'inibizione dell'enzima DNA-metiltransferasi, responsabile della

metilazione del DNA, è in grado di riattivarne l'espressione (Nojima *et al.*, 2001; Rody *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2004). In generale, la presenza del recettore ER $\beta$  nelle cellule tumorali conferisce una prognosi generalmente migliore, mentre la sua perdita può essere considerata una caratteristica di trasformazione maligna (Dotzlaw *et al.*, 1999; Leygue *et al.*, 1998; Hiroshi Sugiura, 2007; Fox *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2008).

## **1.6 Asse ipotalamo-ipofisi**

Nella gonade maschile hanno luogo la produzione, la secrezione degli steroidi sessuali e la maturazione delle cellule della linea seminale. L'asse endocrino riproduttivo maschile consta di diversi organi: l'ipotalamo, un'area posta alla base del cervello, che secerne il GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*); l'ipofisi, situata sotto l'ipotalamo, da cui derivano le gonadotropine (LH, *Luteinizing Hormone* ed FSH, *Follicle Stimulating Hormone*), ed il testicolo, sede della produzione dei principali ormoni steroidei sessuali maschili e della spermatogenesi. Un'insufficiente attività dell'ipotalamo si accompagna ad una inadeguata secrezione dell'ormone GnRH, alla quale seguono alterazioni della funzione gonadica e della spermatogenesi (Singh *et al.*, 1995). La funzione del testicolo nei Vertebrati è sotto il controllo delle gonadotropine ipofisarie, LH ed FSH: l'azione primaria della gonadotropina LH è indurre la secrezione di testosterone da parte delle cellule interstiziali di Leydig, mentre l'FSH agisce direttamente sul tubulo seminifero, stimolando principalmente le cellule di Sertoli e la maturazione della linea spermatogenetica (Weinbauer *and* Nieschlag, 1993; Sharpe, 1994; McLachlan *et al.*, 1996). La produzione da parte delle cellule di Sertoli di proteine ABP (*Androgen Binding Protein*), che legano con alta affinità il testosterone nella circolazione periferica, fa in modo che si possano raggiungere alte concentrazioni

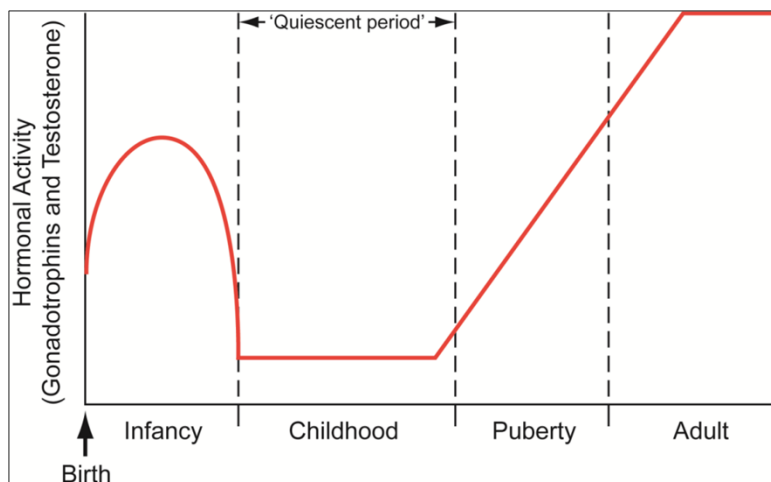
di quest'ormone in alcune sedi del testicolo. In questo modo gli androgeni prodotti dalle cellule di Leydig svolgono con maggiore efficacia la loro azione di stimolo sulla funzione spermatogenetica (Weinbauer *and* Nieschlag, 1993; Sharpe, 1994; McLachlan *et al.*, 1996) (Figura 13).



**Figura 13:** La corretta attività del testicolo dipende da una regolare funzione dell'asse endocrino riproduttivo. Il GnRH, prodotto dall'ipotalamo, arriva all'adenoipofisi (ipofisi anteriore) dove si lega a specifici recettori sulla membrana basale delle cellule gonadotrope e, attraverso l'aumento della concentrazione intracellulare dello ione calcio, induce la liberazione di LH ed FSH già sintetizzati dalla cellula. Le gonadotropine, attraverso la circolazione sistemica, giungono poi a stimolare la funzione gonadica. Se il testosterone è in eccesso, è aromatizzato in estradiolo che raggiunge l'ipotalamo inibendo il rilascio di GnRH. Le cellule di Sertoli producono inibina, che agisce mediante un meccanismo a *feedback* negativo sulla secrezione dell'FSH (Mitchell *et al.*, 2009).

Le concentrazioni di gonadotropine e di testosterone nel sangue periferico sono discretamente elevate in alcune fasi della vita fetale ed in particolare nei primi mesi dopo la nascita. I livelli di testosterone, FSH e LH si mantengono molto bassi durante tutto il periodo prepuberale, mentre all'insorgere della pubertà tali concentrazioni

aumentano, provocando lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari. I livelli di testosterone raggiungono concentrazioni elevate negli individui giovani, e diminuiscono progressivamente durante la senescenza (Winter *et al*, 1975; Foresta *et al*, 1973) (Figura 14).



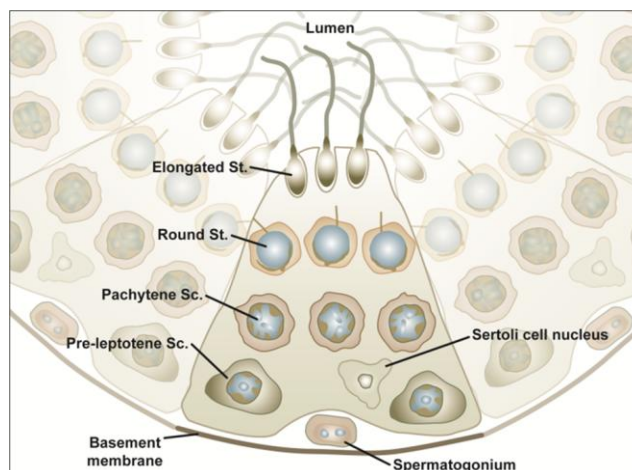
**Figura 14:** Le concentrazioni di gonadotropine e di testosterone durante la pre-puertà e la pubertà (Mitchell *et al.*, 2009).

Allo stesso tempo, il numero totale di cellule germinali testicolari aumenta nei primi mesi di vita in parallelo con i cambiamenti nel siero dei livelli di gonadotropine e androgeni (Muller *et al*, 1984). Successivamente, il numero di cellule germinali testicolari decresce, raggiungendo la conta più bassa per tubulo dall'età di due anni, seguita da un graduale aumento durante il periodo prepuberale. Al momento della comparsa della pubertà, il numero di spermatogoni per tubulo cresce rapidamente in concomitanza con un aumento delle concentrazioni nel siero di gonadotropina e androgeni, un aumento del diametro dei tubuli e l'inizio dell'attiva spermatogenesi (Hadziselimovic *et al*, 1987).

## 1.7 Spermatogenesi

Dal punto di vista funzionale il testicolo può essere suddiviso in due strutture principali: il tessuto interstiziale ed i tubuli seminiferi. Il tessuto interstiziale contiene il sangue ed i vasi linfatici essenziali per il movimento di ormoni e sostanze nutritive, dentro e fuori dalla gonade. Nell'interstizio si ritrovano le cellule di Leydig che, in risposta all'ormone LH ipofisario, sono coinvolte nella secrezione di androgeni, in particolare di testosterone, rapidamente emesso all'esterno della cellula per diffusione.

Da qui può diffondere nel compartimento vascolare e raggiungere, attraverso la circolazione sanguigna, le varie zone dell'organismo dove svolge la sua azione. Il tubulo seminifero contiene le cellule somatiche di Sertoli e le cellule della linea germinale. Le cellule di Sertoli compongono la barriera emato-testicolare che separa le forme più immature delle cellule della linea germinale da quelle più mature, svolgendo una funzione essenziale per il trofismo e la normale maturazione degli spermatozoi (Dym and Fawcett, 1970; Leblond and Clermont, 1952; Russell, 1993) (Figura 15).



**Figura 15:** Sezione trasversale di un tubulo seminifero. Si può notare la presenza di un lume, circondato da cellule che poggiano su una membrana basale. Le cellule della linea seminale sono disposte in maniera rigorosa ed ordinata: le cellule immature (spermatogoni fino allo stadio del leptotene) si trovano tra la lamina basale del tubulo seminifero e la barriera emato-testicolare, mentre le cellule più mature cioè gli spermatozoi, gli spermatidi e gli spermatozoi sono progressivamente più distali, disponendosi tra la barriera ed il lume del tubulo (Mitchell *et al.*, 2009).

La spermatogenesi è il meccanismo attraverso il quale avviene la maturazione progressiva delle cellule della linea seminale fino alla formazione degli spermatozoi, i gameti maschili in grado di indurre il concepimento. Lo sviluppo delle cellule germinali si articola in tre fasi: (1) la *spermatogenesi*, che rappresenta la fase proliferativa e maturativa; (2) la *spermiogenesi*, o *spermioistogenesi*, che costituisce la fase differenziativa e, infine (3) la *spermiazione*, ossia la fase di rilascio dal testicolo.

Gli spermatogoni sono le cellule germinali più indifferenziate del testicolo e comprendono spermatogoni di tipo A (le vere cellule staminali nella popolazione delle cellule germinali), spermatogoni intermedi (che si trovano solo nei roditori), e spermatogoni di tipo B, al di sotto della barriera emato-testicolare e che verranno indirizzati verso la differenziazione (O'Donnell *et al.*, 2001). Dopo l'ultima mitosi degli spermatogoni di tipo B, si formano gli spermatociti primari: lo spermatogonio che entra nella prima tappa della prima divisione meiotica (Profase I) si chiama *spermatocita I*, quello che entra nella seconda divisione meiotica si chiama *spermatocita II*.

Durante la profase della prima divisione meiotica, le cellule germinali vanno incontro a transizioni morfologiche che possono essere classificate sulla base delle dimensioni e della morfologia nucleare (Hess, 1990). Nella fase di zigotene si verifica l'accoppiamento dei cromosomi omologhi, e le cellule con cromosomi completamente accoppiati sono chiamati spermatociti in pachitene. Dopo la fase di pachitene, segue una breve fase di diplotene, in cui le coppie di cromosomi si separano parzialmente, e le cellule subiscono la prima divisione meiotica per dare gli spermatociti secondari. Queste cellule vanno rapidamente incontro alla seconda divisione meiotica per diventare *spermatidi* aploidi. Terminata la meiosi si conclude la fase di spermatogenesi.

Gli spermatidi hanno inizialmente una forma tondeggiante con un abbozzo di polarità ma progressivamente si trasformano in cellule sempre più differenziate che



assumono la struttura e la forma degli spermatozoi. La differenziazione in spermatidi maturi di forma allungata si svolge, senza ulteriori divisioni, durante la spermiogenesi che comporta: (1) lo sviluppo dell'acrosoma, che contiene gli elementi litici per attraversare i rivestimenti dell'ovocita; (2) la formazione del flagello, che è l'apparato motorio; (3) la condensazione della cromatina, il rimodellando e l'allungamento del nucleo, con la rimozione del citoplasma prima del rilascio degli spermatidi durante spermiogenesi (Leblond *and* Clermont, 1952; Russell *et al.*, 1990). Dopo l'allungamento degli spermatidi, il nucleo fortemente condensato diventa incapace di trascrivere, e gli spermatidi circolari immaturi trascrivono alti livelli di mRNA soggetti a ritardi traslazionali fino a quando la traduzione è richiesta per l'allungamento (Braun, 1998).

La spermiogenesi si conclude con il rilascio degli spermatozoi nel lume del tubulo seminifero: attraverso il sistema della *rete testis* giungono all'epididimo e di qui all'esterno tramite il dotto deferente e gli altri canali dell'apparato urogenitale (Russell, 1993). È durante il passaggio attraverso le vie genitali maschili, e in particolar modo nell'epididimo, che gli spermatidi subiscono un serie di cambiamenti biochimici per diventare spermatozoi mobili capaci di fecondazione.

## **1.8 Spermatogenesi e variazioni dei livelli degli ormoni sessuali nel modello *Podarcis sicula***

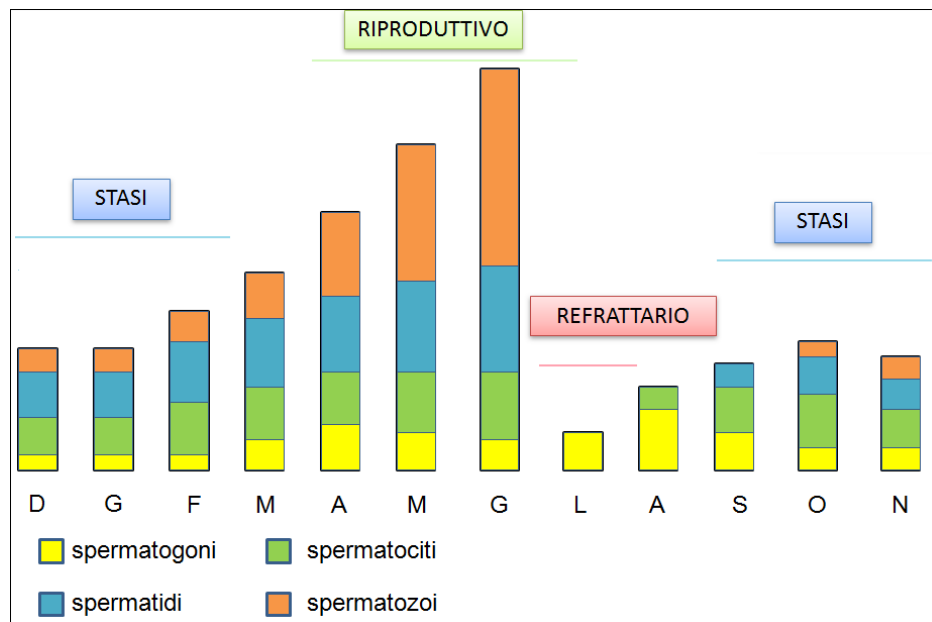
Il rettile *Podarcis sicula* è un Vertebrato non mammifero a riproduzione stagionale e rappresenta un modello di studio semplice e comodamente reperibile, essendo tra i Lacertidi la più diffusa e conosciuta nel panorama italiano.

L'organizzazione delle cellule germinali e degli elementi somatici in questo organismo è molto meno complessa di quella dei mammiferi, pur essendo

sostanzialmente simile. In *Podarcis sicula* sono ampiamente conosciute l'evoluzione delle modalità e delle strategie riproduttive e le variazioni nei livelli ormonali durante il ciclo riproduttivo, inoltre lo sviluppo e l'attività gonadica, come in altri vertebrati, sono sotto il controllo del sistema ipotalamo-ipofisario.

I maschi adulti della lucertola *Podarcis sicula* mostrano un ciclo spermatogenetico annuale con due periodi di attività (primavera e autunno), intervallati da due periodi di stasi (estate e inverno). Nel periodo di massima attività, che va da Aprile a Giugno, i tubuli seminiferi sono ben sviluppati e con cellule germinali a diversi stati di maturazione, compresi molti spermatozoi. Tra la metà e la fine del mese di Luglio, quando ancora le condizioni ambientali sono ottimali, inaspettatamente la spermatogenesi subisce un forte e repentino rallentamento: gli spermatogoni cessano quasi del tutto di dividersi, mentre le altre cellule germinali vanno incontro a degenerazione. In estate la gonade subisce una crisi rapida e profonda: il testicolo, a fine Luglio, regredisce, i tubuli seminiferi si riducono di diametro, con un lume per lo più virtuale, e si ritrovano solo spermatogoni e cellule del Sertoli, come negli animali sessualmente immaturi. In questo periodo le lucertole adulte risultano insensibili ai fattori endogeni ed esogeni che normalmente stimolano l'attività gametogenetica; tale fase viene infatti definita "*refrattaria*". Dopo la crisi estiva, segue un periodo di lieve ripresa (da metà Agosto/inizi di Settembre, sino a fine Ottobre), in cui la spermatogenesi si riattiva, seppur molto lentamente: diversi spermatogoni entrano in mitosi e compaiono pochi spermatozoi. Ad Ottobre la spermatogenesi diviene più intensa, nei tubuli seminiferi si notano cellule germinali a tutti gli stadi. Da metà Novembre, sino agli inizi di Marzo, si instaura un secondo periodo di stasi, causato dalle basse temperature ambientali (4-10 °C), che si protrarrà per quasi tutto l'inverno. Nei tubuli seminiferi si riscontrano rarissime mitosi degli spermatogoni, mentre

numerose sono le degenerazioni soprattutto a livello degli spermatidi. Ad Aprile, quindi con l'innalzarsi delle temperature, la spermatogenesi riprende in maniera più intensa, fino ad arrivare alla sua massima attività nel mese di Maggio in cui nei tubuli seminiferi si riscontrano numerose mitosi spermatogoniali, un evidente aumento di spermatociti I e II e di spermatidi. La spermatogenesi resta attiva fino a metà Luglio, quando subentra nuovamente la crisi estiva, e quindi il fenomeno della refrattarietà (Ciarcia *et al.*, 1985) (Figura 16).

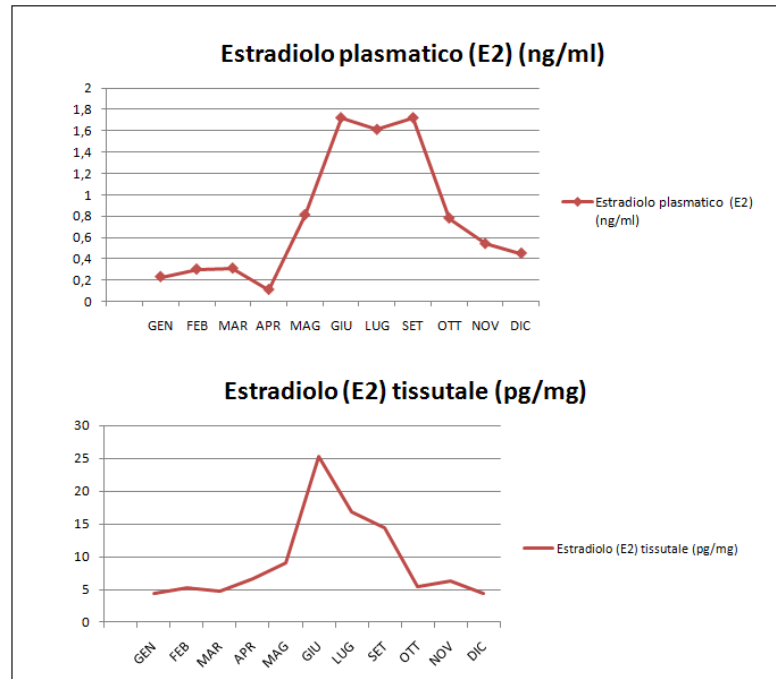


**Figura 16:** Rappresentazione schematica della spermatogenesi discontinua del rettile *Podarcis sicula*.

Durante i differenti momenti del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula* si osservano caratteristiche variazioni dei livelli plasmatici ed intragonadici degli ormoni sessuali (Ciarcia *et al.*, 1986; Andò *et al.*, 1990; Andò *et al.*, 1992; Ciarcia 1993).

Il testosterone giunge al suo massimo livello nel plasma nel mese di Marzo, non appena comincia la ripresa spermatogenetica e lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari, con un picco nei primi di Aprile, quando la spermatogenesi è già attiva.

Analogamente, il  $5\alpha$ -diidrotestosterone e l'androstenedione, presentano la più alta concentrazione in Aprile, mentre il deidroepiandrosterone aumenta in inverno. Da metà Aprile, quando cominciano gli accoppiamenti, gli androgeni diminuiscono rapidamente, sino a portarsi a concentrazioni minime in concomitanza con la crisi spermatogenetica di metà Luglio. Durante la fase refrattaria si riscontra, d'altro canto, un progressivo incremento plasmatico del progesterone e dell'estradiolo. A partire da Ottobre gli estrogeni diminuiscono e a fine Novembre, in coincidenza con il termine della refrattarietà, raggiungono valori minimi. Per tutto l'autunno e l'inverno non si notano variazioni. Durante il ciclo, variazioni del contenuto in ormoni sessuali interessano anche la gonade: il testosterone mostra un andamento bifasico, aumenta in Marzo, in corrispondenza con l'accrescimento del livello nel plasma, e poi si ha una singolare ripresa nel mese di Luglio, quando ormai ogni attività spermatogenetica è interrotta (gonade refrattaria). Un'evoluzione simile presenta anche l'androstenedione, mentre il  $5\alpha$ -diidrotestosterone è ben rappresentato in Aprile. Progesterone ed estradiolo, nel testicolo, aumentano significativamente in estate (Figura 17).



**Figura 17:** Variazioni ormonali plasmatici e testicolari dell'ormone  $17\beta$ -estradiolo durante la spermatogenesi discontinua del rettile *Podarcis sicula*.

Gli andamenti dei livelli intra-testicolari degli androgeni sono in sintonia con le funzioni assegnate a questi ormoni, in tutti i Vertebrati, nel controllo della spermatogenesi e dello sviluppo dei caratteri sessuali secondari.

## **2. Scopo**

Il dinamico moltiplicarsi per mitosi di singole cellule costituisce il processo di proliferazione cellulare, fenomeno essenziale durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto. La serie di eventi che porta da una divisione cellulare alla successiva, è detta ciclo cellulare, convenzionalmente suddiviso in più stadi denominati: G1-S-G2-M. Le fasi di Gap (G1 e G2), di durata variabile, separano l'evento di sintesi (S) del DNA e la divisione mitotica (M) della cellula. Il periodo compreso fra due mitosi successive è detto interfase. La proliferazione cellulare deve essere correttamente bilanciata da meccanismi apoptotici, ovvero di morte cellulare programmata che, se alterati, determinano l'insorgenza di un'ampia varietà di condizioni patologiche come le malattie neurodegenerative e le neoplasie maligne. Non a caso, nelle cellule tumorali, il controllo del meccanismo di morte cellulare programmata è alterato o completamente annullato.

Le mutazioni geniche più frequenti nelle lesioni cancerose sono a carico di geni onco-soppressori ed oncogeni. Tra di essi, i recettori attivati dai proliferatori dei perossisomi (PPAR, *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) ed i recettori degli estrogeni (ER, *Estrogen Receptor*), sono particolarmente studiati per le loro proprietà pro-differenziative e pro-apoptotiche.

Il coinvolgimento del recettore PPAR $\gamma$  nei tumori é stato per la prima volta osservato quando è stato dimostrato che esso inibiva la proliferazione dei fibroblasti durante il differenziamento del tessuto adiposo nel liposarcoma; le cellule messe in coltura a partire da liposarcomi infatti, rispondono ai ligandi di PPAR $\gamma$  con un evidente differenziamento (accumulo di lipidi, arresto della crescita ed espressione di mRNA specifici del processo differenziativo di tale tessuto) (Tontonoz *et al.*, 1998). Il recettore PPAR $\gamma$  é espresso in diversi tessuti neoplastici epiteliali dell'uomo, tra cui la mammella, la prostata, il testicolo ed il colon (Sarraf *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 2000;

Elstner *et al.*, 1998). A livello della prostata, agonisti di PPAR $\gamma$  inibiscono la proliferazione cellulare, diminuendo inoltre l'espressione dell'antigene prostata-specifico (PSA), un marcatore molecolare direttamente associato al volume del tumore prostatico (Kubota *et al.*, 1998).

L'ormone steroideo 17 $\beta$ -estradiolo è un regolatore primario per la crescita, il differenziamento e lo sviluppo sessuale (Hall *et al.*, 2001). In particolare, il recettore ER $\beta$  mostra un effetto anti-tumorale in molti tipi cellulari e la sua presenza conduce ad un blocco degli effetti proliferativi attivati dal complesso E<sub>2</sub>-ER $\alpha$ . Nelle cellule di carcinoma mammario (MCF-7) che esprimono stabilmente la proteina ER $\beta$ , il recettore regola più componenti del *pathway* di TGF $\beta$ , fattore di crescita normalmente associato all'inibizione della proliferazione delle cellule del cancro al seno e delle cellule epiteliali del colon (Paruthiyil *et al.* 2004; Barone *et al.*, 2010; Warner and Gustafsson, 2010). Il gene *ESR2*, inoltre, è fortemente espresso nel tratto riproduttivo maschile, dove la maggior parte dei tumori testicolari ( $\approx$  95%) ha origine germinale e si sviluppa a partire da cellule seminali trasformate durante la vita fetale (Giwerzman *et al.*, 1993).

Partendo da queste considerazioni e dai dati presenti in letteratura, il mio progetto di Dottorato di Ricerca, eseguito presso il laboratorio di Endocrinologia Comparata (ECLab) del Prof. Gaetano Ciarcia, del Dipartimento delle Scienze Biologiche dell'Università Federico II di Napoli, in collaborazione con il laboratorio di Malattie Genetiche Umane del Prof. Alfredo Ciccodicola dell'Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati-Traverso" del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Napoli, si è incentrato sull'analisi del possibile ruolo dei geni *PPARG* ed *ESR2* come fattori anti-proliferativi e pro-apoptotici nella proliferazione cellulare.

Il processo di spermatogenesi costituisce un modello particolarmente adatto per lo studio del controllo della crescita cellulare, essendo costituito da una serie ordinata -



e finemente regolata - di eventi proliferativi e maturativi delle cellule della linea germinale, sottoposti al controllo di meccanismi regolativi genetici, paracrini ed ormonali. Nel progetto di Dottorato è stato utilizzato come modello sperimentale il rettile *Podarcis sicula*, un vertebrato non mammifero a riproduzione stagionale molto diffuso in Campania, la cui fisiologia riproduttiva è ben nota, così come il profilo annuale degli ormoni sessuali.

In particolare, la spermatogenesi del rettile sessualmente maturo *Podarcis sicula*, si è rivelata una privilegiata strategia di indagine per l'osservazione della crescita cellulare e di fenomeni difficilmente esaminabili in organismi più complessi come l'uomo. Nell'uomo, infatti, la trasformazione dei gonociti in spermatogoni è di solito completa all'età di 6 mesi, ma gli spermatogoni non proliferano finché non sopraggiunge la pubertà, quando entra in funzione il sistema di regolazione endocrina, che promuove un aumento del diametro dei tubuli seminiferi, la formazione degli spermatozoi e l'inizio di un'attiva spermatogenesi (Hadziselimovic *et al.*, 1987; Huff *et al.*, 1989, 1991; Dunkel *et al.*, 1997). Nel testicolo di *Podarcis sicula*, invece, la massima attività proliferativa delle cellule germinali è limitata ad un periodo ben determinato (solitamente in primavera), si blocca completamente nella fase refrattaria (estate) ed è fortemente rallentata nei restanti periodi (autunno-inverno).

Data la mancanza (o la scarsissima presenza) delle sequenze genomiche relative ai due recettori in *Podarcis sicula*, il punto di partenza di questo lavoro di tesi è stato il clonaggio ed il sequenziamento completo di entrambi i geni codificanti i suddetti recettori. Conoscendo la sequenza dei geni da analizzare è stato possibile studiare l'elevata conservazione evolutiva dei due recettori nucleari tra le diverse classi di vertebrati, nonché analizzare il loro profilo d'espressione nei diversi periodi del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*. Quest'analisi ha permesso di evidenziare una stretta

correlazione, peraltro già nota in letteratura nel campo dell'oncologia endocrina, tra i livelli di espressione del recettore PPAR $\gamma$  e quelli del recettore ER $\beta$ , confermando l'effetto reciprocamente inibitorio sul processo maturativo della gonade maschile e, più in generale, sul *pathway* di sopravvivenza cellulare. Recenti studi hanno infatti dimostrato nell'uomo l'esistenza di un *cross-talk* negativo tra il recettore estrogenico ed il recettore PPAR $\gamma$ .

Contemporaneamente agli studi molecolari effettuati sulla spermatogenesi dell'organismo modello *Podarcis sicula*, è stata eseguita un'estesa analisi bioinformatica nel genoma umano per verificare la presenza di eventuali trascritti alternativi nelle regioni genomiche corrispondenti ai geni *PPARG* e *ESR2*, al fine di identificare nuove isoforme potenzialmente coinvolte nei processi di proliferazione cellulare. In particolare, partendo da un'analisi *in silico* delle librerie EST (*Expressed Sequence Tag*) nelle regioni genomiche in cui sono mappati i due geni *PPARG* ed *ESR2*, è stato possibile identificare un nuovo trascritto - ed una nuova isoforma proteica - del gene *PPARG*, denominata  $\gamma\Delta 5$ . L'analisi di espressione in tessuti normali e tumorali di colon ed il suo sequenziamento hanno consentito di osservare una delezione completa dell'esone 5. La presenza di tale trascritto, è stata verificata attraverso RT-PCR semiquantitativa in un diverso gruppo di tessuti umani, normali e tumorali. La successiva analisi bioinformatica ha permesso di stabilire che la proteina codificata dal trascritto alternativo  $\gamma\Delta 5$ , pur avendo ancora intatti il dominio di legame al DNA e quello di eterodimerizzazione, manca del dominio di legame al ligando. Analogamente a quanto recentemente dimostrato per l'isoforma  $\gamma\text{ORF4}$  del gene *PPARG* (Sabatino *et al.*, 2005), è stato ipotizzato che tale proteina agisca come dominante negativo rispetto all'isoforma *wild-type* del recettore, favorendo la trasformazione cellulare maligna nei tumori umani.

Sebbene sia ormai stato dimostrato l'effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico dei recettori PPAR $\gamma$  ed ER $\beta$  nella regolazione della crescita tumorale, non sono ancora ben noti i meccanismi molecolari attraverso cui essi agiscono. I risultati ottenuti durante il Progetto di Dottorato di Ricerca rappresentano un buon punto di partenza per una migliore comprensione del ruolo pro-apoptotico dei recettori PPAR $\gamma$  ed ER $\beta$ .

### **3. Materiali e Metodi**

### 3.1 Animali

Esemplari maschi sessualmente maturi del rettile *Podarcis sicula* sono stati catturati nella città di Napoli (Italia) e provincia, nel corso delle tre principali fasi del ciclo riproduttivo, che corrispondono ai mesi di Dicembre-Gennaio (stasi invernale), Maggio (fase della piena attività delle gonadi) e Luglio (fase di regressione testicolare). Gli animali sono stati sacrificati sotto anestesia e, per ciascun esemplare, sono stati asportati testicoli ed encefalo in modo asettico. Gli organi sono stati rapidamente congelati nel -80°C per la seguente estrazione di RNA.

### 3.2 Estrazione di RNA da tessuti

L'estrazione di RNA consente di isolare RNA da tessuti, liquidi biologici o da cellule in coltura, siano essi animali o vegetali, eucariotiche o procariotiche.

Quando si lavora sull'RNA tutti i passaggi devono essere svolti con reagenti e materiali perfettamente sterili e nuovi affinché siano privi di RNasi e si devono sempre utilizzare soluzioni preparate con H<sub>2</sub>O-DEPC, cioè acqua trattata con dietilpirocarbonato, per evitare la degradazione dell'acido ribonucleico ad opera delle ribonucleasi. Sono stati usati guanti e mascherine per non aspirare i vapori, si è inoltre evitato il contatto con la pelle ed i vestiti. La procedura è stata eseguita ad una temperatura compresa tra i 15°C e 30°C. È possibile schematizzare un protocollo di estrazione di RNA in 5 passaggi chiave:

#### 1) Omogenizzazione

Il tessuto viene omogenato direttamente in TRIZOL (1 ml/50-100 mg di tessuto) usando un omogenizzatore o un pestello manuale.

#### 2) Separazione

L'omogenato viene incubato per 5 minuti a temperatura ambiente in modo da far dissociare completamente i complessi nucleoproteici.

Si aggiungono 200 µl di cloroformio per ogni ml di TRIZOL utilizzato e si agitano i tubi vigorosamente per 15 secondi incubandoli successivamente a temperatura ambiente per 2-3 min. I campioni vengono a questo punto centrifugati ad un massimo di 12000 g per 15 minuti a 4°C: ciò permette la separazione della miscela in tre fasi: una fase inferiore di colore rosso con il fenolo-cloroformio contenente il DNA e le proteine, un'interfase ed una fase superiore acquosa che contiene l'RNA. (Il volume della fase acquosa è all'incirca il 60% del volume usato per l'omogenizzazione). E' importante centrifugare il campione a basse temperature per evitare che piccole quantità di DNA rimangano nella fase acquosa alterando la qualità dell'RNA e disturbando eventuali RT-PCR successive.

### 3) Precipitazione Dell'RNA

La fase acquosa ottenuta dalla centrifugazione precedente viene trasferita in un nuovo tubo mentre la fase organica è conservata per una eventuale estrazione di DNA o di proteine. Si aggiungono, alla fase acquosa, 500 µl di alcool isopropilico per ogni mL di TRIZOL utilizzato e la soluzione finale viene incubata a T ambiente per 10 minuti. Si centrifuga ad un massimo di 12000 g per 10 minuti a 4°C: l'RNA precipita sotto forma di pellet gelatinoso sul fondo del tubo.

### 4) Lavaggio Dell'RNA

Il surnatante ottenuto con tale centrifugazione viene eliminato e si lava il pellet di RNA con 1 mL di Etanolo 75% per ogni mL di TRIZOL usato. Si centrifuga la mix a 12000 g per 5 minuti a 4°C.

### 5) Risolubilizzazione Dell'RNA

Dopo aver rimosso l'Etanolo, il precipitato viene fatto asciugare all'aria finché non diviene trasparente; di norma è utile non fare asciugare l'RNA sotto vuoto e completamente altrimenti se ne diminuisce la solubilità. Si risospende il pellet in acqua RNasi-free trattata con DEPC (dietilpirocarbonato) o 0,5% SDS.

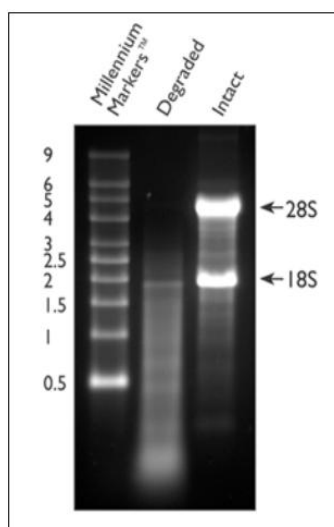
A questo punto si utilizza lo spettrofotometro per determinare la concentrazione dei campioni e valutare, attraverso il rapporto tra le assorbanze  $A_{260}/A_{280}$  (di norma tra i valori 1,8-2,0), il loro grado di purezza. Si può infine far correre i campioni su un gel di agarosio all'1%, immerso in MOPS (vedi paragrafo seguente), per valutarne l'integrità. I campioni sono infine conservati a - 80°C.

### **3.3 Gel di agorosio per RNA in tampone MOPS**

Tale procedura si effettua per osservare l'integrità dell'RNA dopo la sua estrazione da campioni biologici quali tessuti o cellule. I campioni di RNA estratti nel corso di questo lavoro di Dottorato sono stati fatti correre su un gel di agarosio all'1%, senza bromuro di etidio, immerso in tampone elettroforetico 1x MOPS (acido N-morpholino propansulfonico). In generale, prima della corsa elettroforetica, i campioni vengono preparati nel seguente modo:

- ✓ 1 µl di RNA (circa 1 µg) viene aggiunto a 10 µL di di tampone di caricamento con bromuro di etidio;
- ✓ successivamente i campioni sono incubati 10 minuti a 68°C e poi 2 minuti in ghiaccio in modo da destabilizzare le strutture secondarie dell'RNA;
- ✓ i campioni sono quindi caricati sul gel, sottoposti a corsa elettroforetica e visualizzati ai raggi UV di un trans illuminatore.

In questo modo si osservano su gel tre bande: le prime due bande rappresentano le componenti di RNA maggioritarie e ad alto peso molecolare cioè gli rRNA 28S e 18S, l'ultima banda è costituita da molecole più piccole ma abbondanti come gli rRNA 5,8S e 5S o il tRNA. Gli RNA messaggeri non sono visibili perché nella cellula sono presenti ciascuno in piccole quantità (Figura 18).

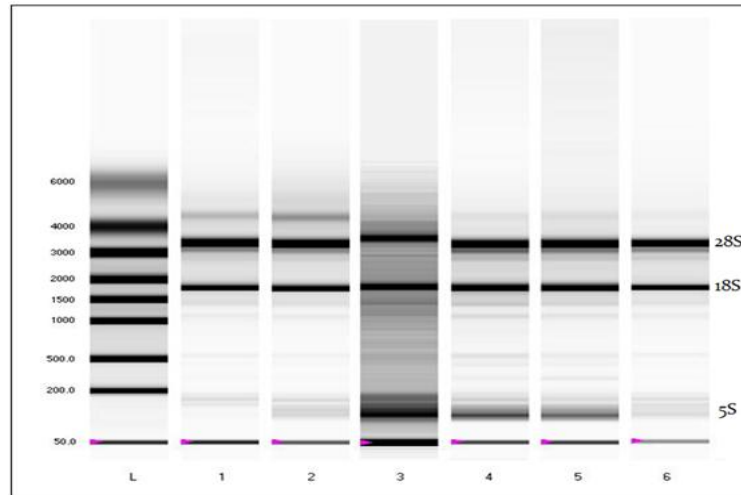


**Figura 18:** RNA intatto vs RNA degradato. Le bande 18S e 28S dell'RNA ribosomiale sono ben visibili nel campione intatto, mentre l'RNA degradato appare come uno *smear* a basso peso molecolare (immagine fornita dal sito Ambion <http://www.ambion.com/index.html>).

### 3.4 Experion<sup>TM</sup> RNA Highsens Analysis kit

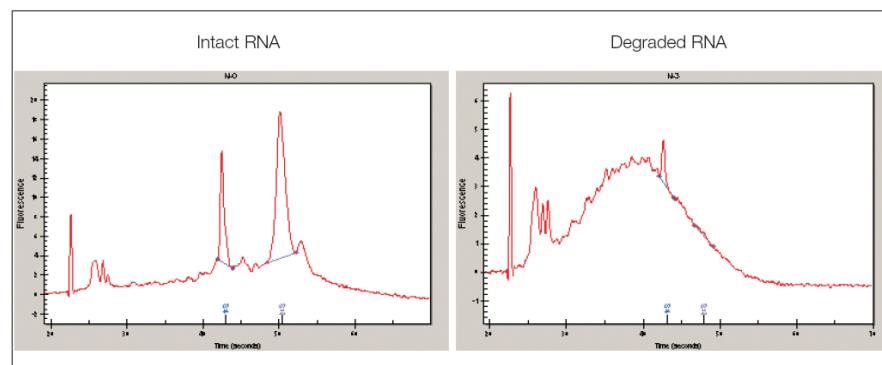
In questo lavoro di tesi, per una maggiore accuratezza, i campioni di RNA sono stati inoltre analizzati mediante l'apparecchio BIORAD Experion<sup>TM</sup> RNA HighSens Analysis, in dotazione al CNR di Napoli. L'analisi mediante Experion<sup>TM</sup> consente di ottenere un'elevata risoluzione nella separazione e nella quantificazione dei campioni di RNA ottenuta attraverso una combinazione di “*LabChip microfluidic technology*” e un RNA *ladder* altamente accurato. In basso è mostrata la proiezione del gel ottenuta tramite Experion dei diversi campioni di RNA corsi (Figura 19).





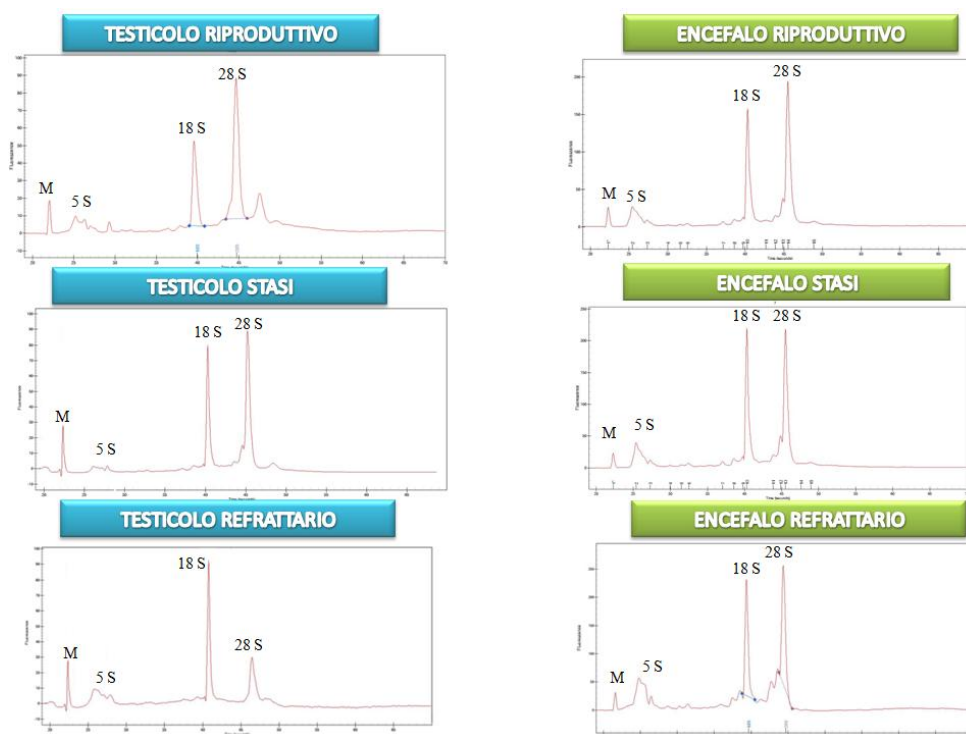
**Figura 19:** Immagine acquisita dopo corsa elettroforetica all'Experion<sup>TM</sup> RNA HighSens Analysis: L) Lower marker; RNA totale estratto da testicolo di *Podarcis sicula* 1) nel periodo di stasi invernale; 2) nel periodo riproduttivo e 3) nel periodo refrattario; RNA totale estratto da encefalo di *Podarcis sicula* 4) nel periodo di stasi invernale; 5) periodo riproduttivo; 6) periodo refrattario.

L'Experion assegna inoltre degli elettroferogrammi per ciascuna estrazione, che consentono di verificare la qualità dell'RNA estratto. In basso, è raffigurato un esempio di un RNA campione, rispettivamente, integro e degradato, fornito dal sito BIORAD ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)) (Figura 20).



**Figura 20:** Elettroferogrammi Experion dell'RNA integro e degradato.

L'analisi attraverso Experion condotta nel corso di questo lavoro di Dottorato, ha fornito degli elettroferogrammi relativi all'estrazione di RNA in ciascun tessuto e nei tre periodi del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*, che hanno confermato la notevole qualità e la purezza dell'RNA estratto (Figura 21).



**Figura 21:** Elettroferogrammi Experion dell'RNA estratto da testicolo e da encefalo di *Podarcis sicula*. Sono evidenziati gli rRNA 5S; 18S e 28S. M: Lower Marker.

### 3.5 Trattamento con DNasi dell'RNA estratto

Tale trattamento è necessario per eliminare i residui di DNA genomico migliorando così la resa delle RT-PCR successive. A tale scopo vengono aggiunti in una Eppendorf da 200 µL:

- 10 µg circa di RNA campione
- 1 µL di 3M Na acetato pH 5.2 (concentrazione finale di 0.1 M)
- 6 µL di 25 mM MgCl<sub>2</sub> (concentrazione finale di 5 mM)
- 1 µL di DNasi (10 U/µl; 1 U per ogni µg di RNA)

- H<sub>2</sub>O fino ad arrivare ad un volume finale di 30 µL

La miscela di reazione si lascia a 25° C per 1 ora poi a 70°C per 15 minuti e successivamente a 4°C. In seguito si aggiungono 60 µL di Etanolo 100% (oppure alcool isopropilico) e 2 µL di 3 M acetato di sodio, mescolando manualmente.

La miscela viene successivamente incubata a 70°C per 1 ora o “*overnight*” ed in seguito centrifugata a 12000 g per 15 minuti a 2-8°C; dopo la centrifugata, viene aspirato il surnatante ed il precipitato di RNA viene lavato con 100 mL di 70% Etanolo e la miscela è sottoposta a centrifugazione di 12000 g per 10 minuti a 2-8°C. Il precipitato ottenuto viene infine risospeso in 15-20 µL di acqua “RNasi-free”(15-20 µl).

### 3.6 PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reazione a catena della polimerasi) è una tecnica che consente di amplificare esponenzialmente una sequenza di acido nucleico. Altre tecniche di amplificazione richiedono l'utilizzo di vettori (plasmidi, virus e cosmidi) per trasferire il DNA da amplificare in cellule viventi, dove verrà poi clonato; la PCR permette invece di risparmiare a tutti i livelli, consentendo l'amplificazione della sequenza *in vitro*.

Per ottenere ottimi risultati bisogna considerare alcuni parametri fondamentali relativi al campione da amplificare:

- Purezza: infatti in determinate concentrazioni ci possono essere contaminanti che fungono da inibitori (Sali, SDS, Urea) disturbando la reazione ed alterando quantitativamente i dati;
- Quantità/Resa: questi fattori dipendono dal materiale di partenza che è quasi sempre un campione biologico;

- Conservazione: è importante soprattutto per l'RNA che va incontro a degradazione molto più facilmente rispetto al DNA.

Condizione fondamentale per l'amplificazione è la conoscenza della sequenza ai lati del tratto che si vuole amplificare in modo da costruire due oligonucleotidi che possano funzionare da inneschi.

Tali oligonucleotidi devono essere *conservati*, *universali* e *degenerati*: essi riconoscono specificamente la sequenza bersaglio e hanno una lunghezza compresa tra i 20 e i 30 nucleotidi. Per la scelta degli oligonucleotidi bisogna tener presente alcune caratteristiche fondamentali:

- Devono essere evitate le unità ripetute in tandem di uno o più nucleotidi;
- la percentuale complessiva in GC e la lunghezza devono essere scelte in modo che la temperatura di annealing dei primer sia uguale o abbastanza simile;
- bisogna evitare sequenze la cui struttura secondaria formi ripiegamenti a forcina o *loop*;
- deve essere evitata la complementarietà tra le due basi all'estremità 3' dei due oligonucleotidi, altrimenti si possono ottenere dimeri di primer che riducono l'efficienza dell'applicazione.

La sintesi di nuovi filamenti di DNA avviene in presenza di dideossinucleotidi trifosfati (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) e di un enzima termostabile, la Taq polimerasi. Il vantaggio di tale enzima consiste nel fatto che viene estratto dal *Thermophilus aquaticus*, un batterio resistente alle alte temperature, per cui sopporta facilmente continui cicli di denaturazione e rinaturazione.

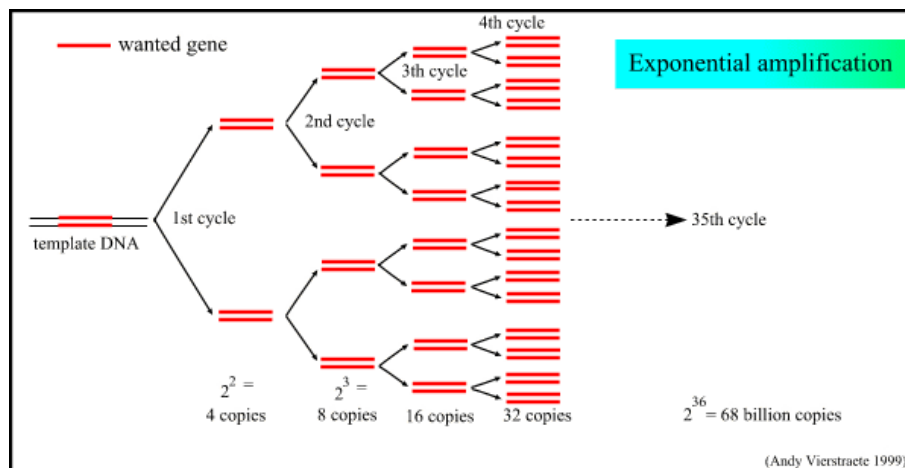
L'enzima è dotato di attività esonucleasica  $5' \rightarrow 3'$  ma manca di attività di correzione di bozze  $3' \rightarrow 5'$ : questo permette che vengano introdotti nucleotidi sbagliati che possono rendere anche meno rapida l'attività esonucleasica.

In particolare, in questo lavoro, è stata utilizzata l'AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), una DNA polimerasi inattiva che viene attivata con il calore (*hot start* a  $95^{\circ}\text{C}$ ). Dopo l'*hot start*, i cicli di amplificazione prevedono generalmente:

	sec	$^{\circ}\text{C}$
<b>Denaturazione</b>	30-60	90-98
<b><i>Annealing</i></b>	30-60	40-60
<b><i>Extension</i></b>	30-120	70-72

La temperatura di denaturazione dipende dallo stampo utilizzato; se è ricco in GC serve una temperatura più elevata per tempi maggiori. La temperatura di “*annealing*” dipende dalla lunghezza e dalla composizione in base degli oligonucleotidi; solitamente si considerano  $2^{\circ}\text{C}$  per ogni A o T e  $4^{\circ}\text{C}$  per ogni C o G. Infine, si utilizza una temperatura di estensione dell'amplificato tra i  $70^{\circ}\text{C}$  e i  $72^{\circ}\text{C}$ , perché in questo intervallo l'enzima ha il suo optimum e la durata di questo periodo dipende dalla lunghezza della sequenza da amplificare.

La PCR si completa con un ciclo di allungamento finale per ottenere prodotti completi dal momento che potrebbe capitare che l'estremo non sia completo e questo creerebbe problemi per un eventuale clonaggio. La PCR è una reazione a catena in cui i filamenti neosintetizzati fungono da stampo per i successivi cicli di amplificazione; il processo è di tipo esponenziale e la quantità di prodotto finale dipende sia dal substrato iniziale che dal numero di cicli che possono variare da 25 a 40 (Figura 22).



**Figura 22:** Reazione esponenziale della PCR.

La miscela di reazione prevede:

Componenti	Quantità (µl)
Buffer 10x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1,5
dNTP 2mM	2
Oligo Senso 10 µM	1
Oligo Antisenso 10 µM	1
AmpliTaq Gold	0,2
H <sub>2</sub> O sterile	15,8

La miscela di reazione preparata in tubi da 0,2 ml viene successivamente posta in termociclatori Eppendorf e sottoposta ai seguenti cicli di reazione:

	min	°C
Attivazione	10	95
Denaturazione	1	95
<i>Annealing</i>	1	52-64
<i>Extension</i>	1	72
<i>Extension</i> finale	10	72

Ogni ciclo è stato ripetuto tra le 30 e le 40 volte sulla base della quantità di DNA amplificato da ottenere. Gli amplificati sono stati successivamente saggiati su gel di agarosio 1,5% contenenti bromuro di etidio 1 µg/µl e corsi in camere elettroforetiche a 90-120 V per 15-20 minuti.

### 3.7 RT-PCR

L'RNA totale isolato da testicolo ed encefalo di *Podarcis sicula*, unitamente con diversi mRNA disponibili in laboratorio e derivati da tessuti quali colon e fegato - sia sano che tumorale -, cervello, rene, cuore, muscolo scheletrico, placenta, carcinoma ovarico, linea cellulare di monociti - U937 - e tiroide, sono stati retro trascritti. L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA (DNA complementare) mediante trascrittasi inversa SuperScript III (Invitrogen). Tale cDNA si utilizza successivamente per le reazioni di PCR.

Il protocollo utilizzato per la trascrizione inversa ha previsto l'aggiunta dei seguenti componenti in un tubino da 0,2 mL:

- 1 µL di Random Esameri (50-250 ng)
- 10 pg-5 µg di RNA
- 1 µL di dNTP mix 10 mM
- H<sub>2</sub>O sterile per arrivare ad un volume totale di 13 µL

La miscela viene riscaldata a 65°C per 5 minuti e successivamente posta in ghiaccio per 1 minuto. Questo trattamento permette di eliminare eventuali aggregati e strutture secondarie di RNA che interferirebbero con la sintesi del cDNA.

Successivamente sono stati aggiunti al tubino i seguenti reagenti:

- 4 µl di First-Strand Buffer 5x
- 1 µl di DTT 0.1 M

- 1 µl di RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor
- 1 µl di SuperScript III RT (200 unità/µl)

Poiché sono stati utilizzati random esameri per la reazione di RT, i tubini vengono incubati a 25°C per 5 minuti.

Successivamente la miscela viene incubata a 50°C per un'ora, dopodiché si procede all'inattivazione dell'enzima al calore a 70°C per 15 minuti in modo da eliminare anche eventuali ibridi RNA-cDNA. Il cDNA così ottenuto può essere utilizzato per le normali amplificazioni di PCR.

### **3.8 Elettroforesi su gel di agarosio**

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica semplice che consente di separare e distinguere frammenti di DNA grazie alla migrazione per carica, forma e peso molecolare. Un gel può essere visualizzato come una rete molecolare attraverso le cui maglie si fanno migrare le macromolecole sotto l'azione di un campo elettrico. Il gel, appoggiato su una lastra di vetro o plexiglas, è percorso dalla corrente orizzontalmente, nel senso della lunghezza.

Essendo il movimento di una particella carica in un campo elettrico dipendente dalla massa e dalla carica della particella, il DNA sottoposto ad una differenza di potenziale, migrerà nel mezzo di supporto dal polo negativo al polo positivo in quanto, in condizioni di pH neutro, è ricco di cariche elettriche negative conferitegli dai gruppi fosfato. Infatti nella cella elettroforetica la corrente elettrica passa attraverso due elettrodi (anodo e catodo) in un mezzo liquido che è il tampone all'interno del quale è immerso il gel. La velocità di migrazione dipende invece da: dimensioni dei frammenti, percentuale di agarosio nel gel e dalla differenza di potenziale applicata.



I frammenti piccoli migrano più velocemente di quelli più lunghi così come anche il DNA circolare (superavvolto) migra più velocemente del DNA lineare. Per la preparazione di un gel è necessario aggiungere in un becker il tampone 1x TAE (Tris-acido acetico-EDTA) e la polvere d'agarosio. Preparati i reagenti si pongono per alcuni minuti, fino all'ebollizione, in un forno a microonde e appena l'agarosio è completamente sciolto nel tampone si porta il becker sotto cappa e vi si aggiunge, adottando le dovute precauzioni, un agente intercalante (generalmente il bromuro di etidio) che consentirà, a corsa elettroforetica avvenuta, di osservare i risultati del gel mediante esposizione alle radiazioni ultraviolette emesse dal transilluminatore.

Infatti l'agente intercalante si lega al DNA, intercalandosi tra le basi, ed emette luce per fluorescenza, se colpito da raggi UV a corta o media lunghezza. Ogni banda, rosa-arancio fluorescente, emessa dal bromuro di etidio, rappresenta un frammento di DNA.

La soluzione ottenuta, addizionata con agente intercalante, viene rapidamente versata in uno stampo per gelificazione con inserita la cameretta elettroforetica e dei pettini grazie ai quali ricavare i pozzetti per caricare i campioni di DNA. A questo punto si lascia solidificare il gel sotto cappa per circa 30 minuti e una volta pronto lo si trasporta con tutta la cameretta elettroforetica nella cella elettroforetica dove verrà completamente immerso nella soluzione tampone e i pozzetti saranno caricati con il materiale da esaminare, addizionato con colorante. Sul gel di agarosio, oltre ai campioni sarà caricato anche un marcatore di peso molecolare noto. Il confronto tra la migrazione delle bande del marcatore con quelle dei campioni consente di determinare il peso molecolare dei frammenti amplificati. La cella elettroforetica è collegata ad un alimentatore grazie al quale viene sottoposta ad un voltaggio iniziale pari a 100 V che, dopo circa 10 minuti, viene lievemente abbassato a circa 70 V.

Dopo circa 20-30 minuti, la separazione è avvenuta e, andando a osservare il gel al transilluminatore, si noteranno delle bande fluorescenti, di una determinata intensità, indice della quantità di DNA presente e rapportabili ad un marker per ottenere ad esempio indicazioni sulla lunghezza dei frammenti.

Il gel d'agarosio è utilizzato per separare frammenti di acidi nucleici di dimensioni comprese fra 200 bp e 20 kb mentre esistono gel a maglia più piccola (ad esempio i gel di poliacrilammide) che consentono di separare proteine o frammenti di DNA più piccoli, permettendo di discriminare, grazie ad una maggiore risoluzione, frammenti che differiscono di pochi nucleotidi. È inoltre possibile sottoporre il gel e visualizzare le bande al Gel Doc (Biorad), *software* che permette l'analisi e l'acquisizione d'immagini di gel di elettroforesi e *array*.

### **3.9 Real-Time PCR**

La *Real-Time* PCR, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA.

La PCR quantitativa è impiegata in un sempre maggior numero di applicazioni nel settore della ricerca, quali la quantificazione dell'espressione genica, profili di espressione, la validazione di dati di *microarray*, l'analisi SNP e la discriminazione allelica, analisi sugli OGM, monitoraggio della carica virale ed altre applicazioni che presuppongano la rilevazione di agenti patogeni.

La *Real-Time* PCR permette di seguire in tempo reale l'andamento della reazione e di quantificare il DNA, cioè di identificare la concentrazione iniziale del DNA stampo ("*template*").

Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA polimerasi. Dopo ogni ciclo di amplificazione, il DNA viene quantificato. Questo è possibile grazie all'introduzione all'interno della reazione di un fluorocromo, che ci dà la possibilità di seguire la reazione da un punto di vista visivo, grazie all'ausilio di appositi “*software*”.

Infatti i metodi comuni di quantificazione includono l'uso di molecole chimiche aspecifiche (SYBR Green, fluoroforo) che si intercalano nel DNA a doppio filamento (dsDNA) e di oligonucleotidi modificati (denominati sonde), cioè marcati alle due estremità con un fluorocromo e con un inibitore della fluorescenza (“quencer”), che emettono fluorescenza una volta ibridati con un DNA.

Poiché l'amplificazione di PCR aumenta la quantità di dsDNA presente, il segnale di fluorescenza aumenta in proporzione. In una reazione ottimizzata, la quantità della sequenza bersaglio arriva quasi a raddoppiare nel corso di ciascun ciclo di amplificazione. Siccome sono necessari parecchi cicli affinché abbastanza prodotto sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide. Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi.

Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato ciclo soglia (Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple consente di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. Il Ct è inversamente proporzionale al numero di copie di “*template*” iniziali. La concentrazione di *template* può essere estrapolata in modo affidabile dall'intensità di fluorescenza solo quando la concentrazione di DNA ha

raggiunto la soglia di rilevamento della fluorescenza. Un più alto numero iniziale di copie è correlabile ad un valore del Ct più piccolo.

Alcuni strumenti permettono all'utente di generare delle curve di "melting" che seguono il completamento della PCR. Le curve di "*melting*" forniscono un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di dimeri degli inneschi ("*primers*").

Si può effettuare una quantificazione assoluta delle concentrazioni di specifici RNA producendo una curva standard di calibrazione; in alternativa si può effettuare una quantificazione relativa rapportando la loro quantità rispetto a quella di un gene di controllo. La quantificazione assoluta può utilizzare dei campioni standard (DNA plasmidico o altre forme di DNA) la cui concentrazione assoluta sia nota. Si deve essere certi, tuttavia, che l'efficienza della PCR sia la stessa per i campioni noti e per quelli ignoti. L'utilizzo di sonde rivelatrici di fluorescenza è il più accurato e il più affidabile dei metodi, ma anche il più costoso. Esso utilizza un RNA a sequenza specifica o una sonda basata su DNA per quantificare solamente il DNA contenente la sequenza della sonda; quindi, l'uso di una sonda rivelatrice di fluorescenza incrementa significativamente la specificità, e permette la quantificazione regolare in presenza di prodotti di amplificazione di DNA non specifici (ad esempio il SYBR Green rivela l'amplificazione di qualsiasi frammento di DNA). Questo metodo alternativo automatizzato, molto promettente, è rappresentato dal saggio *TaqMan*, un sistema di rivelazione con esonucleasi 5', in cui la sonda oligonucleotidica (sonda ad idrolisi *TaqMan*) è marcata ad ogni estremità con un fluorocromo e uno spegnitore (*quencher*).

È un sistema di rivelazione in grado di produrre fluorescenza in tempo reale. In particolar modo, in base a questo metodo, la valutazione quantitativa dell'acido nucleico è affidata, quindi, alla rilevazione e alla conseguente quantificazione di un "*reporter*" il

cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità di prodotto di PCR nella reazione. A tal proposito viene disegnata la sonda oligonucleotidica gene-specifica che si appaia nella zona compresa fra i due *primer* (*forward* e *reverse*). Tale sonda, generalmente lunga 20-30 paia di basi, è marcata con un fluorocromo (*reporter*), solitamente di colore verde, all'estremità 5' ed una molecola spegnitore (*quencher*), di colore rosso, all'estremità 3'. Fino a quando, in altri termini, la sonda resta intatta la vicinanza tra *reporter* e *quencher* annulla l'emissione del segnale di fluorescenza perché si verifica un trasferimento di energia dal primo al secondo. Nel momento in cui la Taq DNA polimerasi, replicando lo stampo, incontra la sonda appaiata al suo interno, grazie alla sua attività esonucleasica 5' → 3', comincia a degradarla a partire dal 5' terminale, rilasciando il *reporter* nella soluzione. L'allontanamento tra il *reporter* ed il *quencher* pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa in modo che il *reporter* inizi ad emettere fluorescenza. Quest'ultima incrementerà a ogni ciclo proporzionalmente al tasso di degradazione della sonda. L'accumularsi del prodotto amplificato viene rilevato monitorando quindi l'incremento di fluorescenza del *reporter*. Registrando la quantità di emissione fluorescente per ogni ciclo è possibile monitorare la reazione di polimerizzazione durante la sua fase esponenziale, nella quale il primo incremento significativo di prodotti neo-sintetizzati è collegato alla concentrazione iniziale di stampo nel campione. Infatti, maggiore è il numero di copie iniziali dell'acido nucleico, prima si osserverà un incremento significativo della fluorescenza. Il protocollo per la *Real-Time* PCR prevede che la miscela di reazione contenga i seguenti componenti:

- 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems): SYBR Green I Dye, AmpliTaq Gold DNA polimerasi, dNTP, buffer
- 160 nM oligo senso; 160 nM oligo antisenso
- 50 ng di cDNA (stampo)

Le condizioni della PCR sono: 95°C per 10 minuti seguiti da 40 cicli di 95°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi e 72°C per 30 secondi. I dati sono raccolti usando il sistema 7900HT Fast *Real-Time* PCR (Applied Biosystems).

Durante questo lavoro di tesi di Dottorato, è stato utilizzato il metodo della quantificazione relativa normalizzando l'espressione dei geni *PPARG* ed *ESR2* di *Podarcis sicula* con il gene di controllo ribosomale (o “house-keeping”) 12S, ciascun saggio è stato eseguito in triplicato per ciascun cDNA. L'espressione genica relativa è stata determinata usando il metodo del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (metodo del delta-delta  $C_t$ ), dove  $C_t$  (*threshold cycle*, ciclo soglia) rappresenta il ciclo di PCR a cui si rileva per la prima volta un incremento di fluorescenza al di sopra della linea di base (linea soglia). Il ciclo soglia è inversamente proporzionale al log del numero di copie iniziali dello stampo. Ad un  $C_t$  basso corrisponde una quantità iniziale di stampo piuttosto alta, maggiore è il numero di copie iniziali di “template” minore sarà il numero di cicli necessari a raggiungere quel valore di fluorescenza che va al di sopra della linea soglia; ad un  $C_t$  alto corrisponde, invece, una quantità iniziale di “template” piuttosto bassa.

### **3.10 Purificazione dei prodotti di PCR dal gel di agarosio**

Questo tipo di protocollo è quello suggerito dalla casa madre (QIAGEN) e permette l'estrazione e la purificazione del DNA da gel di agarosio in tamponi TAE o TBE. Il frammento di gel contenente il DNA da estrarre viene tagliato con un piccolo bisturi ed inserito in una provetta da 1,5 ml per poterlo pesare. A questo punto, per ogni volume di gel si aggiungono 3 volumi di tampone QG (100 mg di gel equivalgono a circa 100 µl) ed il gel si lascia a 50°C per 10 minuti o finché non è completamente disciolto. In seguito si aggiunge 1 volume di isopropanolo, si agita e si inserisce la

miscela in una minicolonna cromatografica centrifugando a 13000 rpm per 1 minuto. La colonna viene successivamente lavata con 75 µl di tampone PE e centrifugata a 13000 rpm per 1 minuto: questa operazione viene ripetuta due volte in modo da eliminare completamente il tampone. Infine, il DNA è eluito con 50 µl di tampone EB (10 mM TRIS-Cl pH8.5) o con H<sub>2</sub>O sterile centrifugando la colonnina a 13000 rpm per 1 minuto.

### 3.11 Vettori plasmidici

In questo lavoro di Dottorato è stato utilizzato un vettore plasmidico per il clonaggio dei frammenti di cDNA (amplificati mediante PCR). Il vettore Topo II Vector (Invitrogen) contiene i seguenti elementi:

- Promotore SP6 per il sequenziamento del filamento senso
- Gene LacZ, codificante una galattosidasi, che comprende il sito d' inserzione del prodotto di PCR. Esso consente di discriminare tra le colonie contenenti o no il frammento amplificato basandosi sul colore delle stesse se cresciute in presenza di un analogo del substrato dell'enzima (X-gal) che diventa blu se il gene è intatto (e quindi l'inserzione non è avvenuta).
- Promotore T7 per il sequenziamento del filamento antisense
- Origine della replicazione derivata dal plasmide pUC che consente di ottenere un elevato numero di copie di plasmide e la crescita in *E. Coli*
- Resistenza all'ampicillina per la selezione del vettore in *E. Coli*

Il costruito plasmide/cDNA viene inserito in cellule procariote competenti mediante un processo noto come trasformazione. Essa è stata condotta su cellule di *Escherichia Coli* (Top10 della Invitrogen), rese competenti chimicamente, fornite

insieme al vettore ed al terreno di coltura SOC medium. La reazione è stata condotta nel seguente modo:

Reagente	Quantità (µl)
Prodotto di PCR	4
Soluzione salina	1
TOPO Vector	1

I reagenti sono stati miscelati ed incubati 30 minuti a temperatura ambiente per permettere l'inserzione del frammento nel vettore.

La miscela di reazione è stata quindi aggiunta alle cellule competenti TOP10 (circa 100µl) ed il tutto è stato posto in ghiaccio per 30 minuti. Le cellule sono state poi sottoposte a shock termico per 1 minuto a 42°C e subito dopo la miscela è stata trasferita in ghiaccio. Questo trattamento permette di modificare la permeabilità della membrana batterica in modo tale da incorporare il DNA nella cellula. Successivamente, i batteri sono stati posti in un falcon con 250 µl di SOC medium (terreno per batteri arricchito) e la miscela così ottenuta è stata posta in agitazione a 37°C per un'ora circa. In seguito la miscela è stata piastrata su terreno selettivo contenente ampicillina: in particolare, sono state utilizzate tre piastre con diverse quantità di miscela (50 e 100 e 200 µl). Le piastre infine sono state incubate 12-16 ore a 37°C.

Le cellule competenti utilizzate sono sensibili all'antibiotico ampicillina ed è il vettore incorporato dalla cellula a conferire resistenza all'antibiotico e a permettere quindi la selezione delle colonie contenenti il vettore.



### **3.12 Estrazione del DNA plasmidico (Midipreparazioni)**

E' stato utilizzato il kit Midiprep (QIAGEN) che permette di estrarre DNA plasmidico da una maggior quantità di cellule batteriche. Il protocollo prevede che una singola colonia venga prelevata da una piastra selettiva e trasferita (o inoculata) in 4 ml di LB contenente ampicillina. Tale inoculo viene incubato a 37°C in agitazione all'incirca per 8 ore e l'intera coltura viene successivamente trasferita in una beuta contenente 200-250 ml di terreno di coltura LB con ampicillina e viene cresciuta a 37°C in agitazione per 12-16 ore.

Dopo la crescita, le cellule batteriche vengono centrifugate a 4°C per 15 minuti a 6000 rpm in un rotore Beckman JA.

Il surnatante viene eliminato mentre il pellet batterico è risospeso in 4 ml di tampone di sospensione contenente RNasi, EDTA e TRIS-Cl pH8, aiutando il processo con il Vortex o la pipetta. Al pellet risospeso si aggiungono 4 ml di soluzione di lisi contenente NaOH ed SDS, e si agita la provetta 4-6 volte incubandola poi per 5 minuti a temperatura ambiente; dopo questa fase, il lisato appare viscoso. Ad esso si aggiungono 4 ml di tampone di neutralizzazione contenente acetato di potassio pH5.5 , e si inverte la provetta 4-6 volte incubando poi il campione in ghiaccio per 15 minuti. In tal modo il lisato diventa meno viscoso a causa della precipitazione del DNA genomico, proteine, dei residui cellulari e del SDS.

Il lisato viene centrifugato a 4°C per 30 minuti a 12000 rpm in rotore Beckman JA e dopo questa fase dovrebbe apparire limpido. Durante la fase di centrifugazione, viene "equilibrata" (cioè adattata) una colonnina "QIAGEN-tip" 100 con 4 ml di soluzione di equilibratura (QBT) contenente 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH7, isopropanolo 15% e Triton X-100 0.15%.

Il surnatante ottenuto viene caricato sulla colonnina e fatto scorrere per gravità. La colonna viene successivamente lavata con 20 ml (2x10 ml) di soluzione di lavaggio contenente NaCl 1.0 M, MOPS 50 mM pH7 e isopropanolo 15%. Il primo lavaggio rimuove i contaminanti dal DNA plasmidico, il secondo è necessario per grossi volumi cellulari.

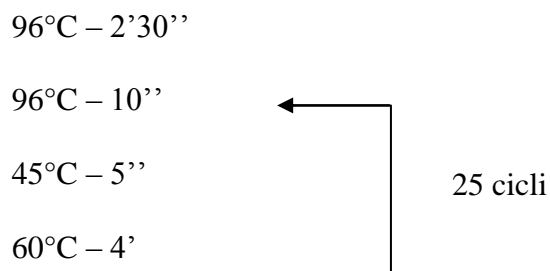
Il DNA plasmidico nella colonnina viene eluito con 5 ml di tampone di eluizione che contiene NaCl 1.6 M, TRIS-HCl pH8.5 e isopropanolo 15%. Il DNA viene precipitato aggiungendo 3,5 ml di isopropanolo a temperatura ambiente. La soluzione viene centrifugata a 4°C per 30 minuti a 8500 rpm in rotore Beckman J-LA e, dopo la centrifugazione, viene eliminato il surnatante. Il pellet di DNA plasmidico viene lavato con 2 ml di etanolo 70% a temperatura ambiente e la soluzione viene centrifugata a 13200 rpm per 10 minuti. A questo punto il surnatante viene rimosso ed il pellet viene asciugato all'aria e risospeso in 100 µl di TE 1x.

### **3.13 Reazione di sequenza**

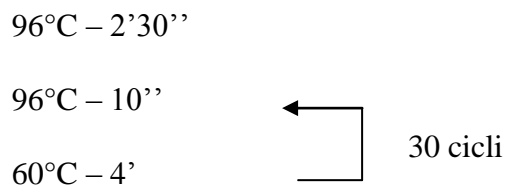
La reazione di sequenza si basa sulla metodica di Sanger e consiste nella copia di una particolare regione di DNA a singolo filamento da parte di una polimerasi in presenza di oligonucleotidi innesco. Oltre ai quattro deossiribonucleosidi trifosfato vengono utilizzati dei dideossiribonucleosidi trifosfato resi fluorescenti dal legame con uno specifico cromoforo. Questi ultimi vengono incorporati normalmente nella catena nascente di DNA ma ne impediscono l'allungamento per la mancanza dell'ossidrile in 3'. Alla fine della reazione si ottiene una popolazione di frammenti fluorescenti di diversa lunghezza tutti con l'analogo dideossi all'estremo 3' del frammento interrotto.

La reazione di sequenza si realizza con il seguente protocollo: 2,5 pmoli/µl per ogni oligo di innesco, 2 µl di una miscela contenente i dideossinucleotidi (mix Big Dye

Terminator-Perkin Elmer), i dideossinucleotidi, una Taq polimerasi, il tampone TACS 5X (400 mM TrisHCl pH 8, 10mM MgCl<sub>2</sub> e 100mM SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> pH 9), 5 µl di DNA (100 ng) ed H<sub>2</sub>O per un volume finale di 10 µl. Per la reazione di sequenza sono state utilizzate due procedure: la prima, comprendente tre passaggi, per gli oligo d'innesco la cui T<sub>m</sub> è minore o uguale a 57°C:



La seconda, a due passaggi, è stata utilizzata per gli oligo d'innesco la cui T<sub>m</sub> è maggiore o uguale a 58°C e prevede:



Al termine della reazione di sequenza i campioni sono stati purificati su una membrana Sephadex G50 mediante centrifugazione a 1700 rpm per 2 minuti; 5 µl del purificato così ottenuto è stato addizionato a 10 µl di formammide deionizzata e denaturato per 3 minuti a 95°C per essere sottoposto ad elettroforesi. L'apparato elettroforetico utilizzato fa parte del sequenziatore automatico ABI PRISM 3100, che opera con un sistema a 16 capillari riempiti con un particolare polimero che funziona da matrice di separazione.

Il sistema capillare è formato da tre parti: una cella di rivelazione, una barra di caricamento e gli elettrodi dei capillari. La cella di rivelazione colloca i 16 capillari nella posizione corretta per l'eccitazione da parte del laser; la barra di caricamento sostiene i capillari e funziona da catodo durante l'elettroforesi.

I campioni sono caricati simultaneamente all'interno dei capillari mediante iniezione elettrocinetica e sono separati elettroforeticamente migrando attraverso il polimero del capillare. Quando il DNA passa attraverso la cella di rivelazione un raggio laser illumina entrambi i lati dei 16 capillari ed eccita i cromofori legati ai frammenti da sequenziale.

La fluorescenza emessa è catturata dalla camera CCD che la converte in un segnale elettrico poi trasferito ad un complesso sistema di programmi denominato DATA COLLECTION che opera la raccolta, il processamento, l'estrazione e l'analisi dei dati. Questi ultimi alla fine vengono visualizzati mediante un elettroferogramma in cui, ad ogni picco di un certo colore, corrisponde una specifica base. In questo modo dalla sequenza dei picchi si risale alla sequenza delle basi azotate del frammento analizzato.

### **3.14 Analisi bioinformatica**

#### **➤ Disegno di oligonucleotidi**

Il programma "Oligo 4.0" permette la costruzione degli oligonucleotidi d'innesco. Partendo da una sequenza nucleotidica nota, è possibile disegnare oligo specifici per l'amplificazione di quella regione. Per prima cosa, si inserisce la sequenza all'interno della quale si vuole costruire la coppia di oligonucleotidi e si seleziona la lunghezza dell'oligo da disegnare (generalmente di 20 nucleotidi). La lunghezza degli oligonucleotidi può essere compresa tra i 20 e i 24 nucleotidi, per consentire un'alta

specificità di legame alla sequenza bersaglio, così da evitare amplificazioni di segmenti di DNA non specifici del frammento da amplificare.

Quindi il *software* indica alcuni possibili oligo per il filamento senso e, dopo aver selezionato il più adatto, si analizza che la sequenza non determini la formazione, al suo interno, di strutture secondarie o *loop* e che abbia un'adeguata temperatura di appaiamento. Dopo aver scelto l'oligonucleotide senso, allo stesso modo si ricerca quello per il filamento antisenso selezionando quello che ha una temperatura compatibile con l'oligonucleotide senso. Nel caso in cui le temperature non fossero compatibili ma l'oligonucleotide fosse stato disegnato in una regione utile per l'amplificazione, si può variarne la lunghezza in modo da aumentare o diminuire la temperatura stessa.

In questo lavoro di Dottorato, per poter identificare e sequenziare i geni *PPARG* ed *ESR2*, non ancora noti nell'organismo animale *Podarcis sicula*, è stato indispensabile un preliminare studio *in silico* delle sequenze relative ai geni in esame in diverse classi di vertebrati. In particolare, per entrambi i geni sono stati realizzati diverse coppie di *primers*, nelle regioni a più elevata identità nucleotidica, utilizzando come genomi di riferimento quello dell'uccello *Gallus gallus* (*PPARG*: NM\_001001460.1; *ESR2*: NM\_204794.1), e quello dei rettili *Eublepharis macularius* per *PPARG* (AB360446.1) e *Elaphe quadrivirgata* per *ESR2* (AB548297.1).

Gli oligonucleotidi così disegnati sono riportati, rispettivamente, nella Tabella 1 (*PPARG*) e nella Tabella2 (*ESR2*). Nella Tabella 3 sono invece indicati i *primers* per l'analisi d'espressione mediante *Real Time* PCR dei geni *PPARG*, *ESR2* e 12S.

Forward Primer 1 <i>PPARG</i> :	Reverse Primer 1 <i>PPARG</i> :
5' ATG GTT GAC ACA GAA ATG CC 3'	5' TGA CAT TCC AAC TGC AAG AC 3'
Forward Primer 2 <i>PPARG</i> :	Reverse Primer 2 <i>PPARG</i> :
5' CAT AAG AAA AGC AGA AAT AA 3'	5' GTC ATG AAT CCT TGT CCA T 3'
Forward Primer 3 <i>PPARG</i> :	Reverse Primer 3 <i>PPARG</i> :
5' TCA TAC ATA AAG TCC TTC CC 3'	5' ATC TGT RTC CGT TTT CTT TAT 3'

**Tabella 1:** Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione del gene *PPARG* in *Podarcis sicula*.

Forward Primer 1 <i>ESR2</i>	Reverse Primer 1 <i>ESR2</i> :
5' AAG AGC CCG TGG TGC GAA3'	5' ATT TCC CCT CGT CCC TGT C 3'
Forward Primer 2 <i>ESR2</i> :	Reverse Primer 2 <i>ESR2</i> :
5' CAC YTC TCT CCT CTG ACA 3'	5' ATG TAA TCG TTG TGT CCT TG 3'
Forward Primer 3 <i>ESR2</i> :	Reverse Primer 3 <i>ESR2</i> :
5' GTT GGC TCG AAG TGT TGA T 3'	5' ACR ACA TTR TTG CAC TTC AT 3'

**Tabella 2:** Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione del gene *ESR2* in *Podarcis sicula*.

<i>PPARG</i> Forward Primer RT:	<i>PPARG</i> Reverse Primer RT:
5' ATG GTT GAC ACA GAA ATG CC 3'	5' CGT ATT TAT AGT CAA CAG CCA 3'
<i>ESR2</i> Forward Primer RT:	<i>ESR2</i> Reverse Primer RT:
5' GTC GGG ATG ATG AAA TGT GG 3'	5' GGC TCG GCT TCA AGT AAT AT 3'
12S Forward Primer RT:	12S Reverse Primer RT:
5' CCA ATA GTA GAC ACA ATA GCC 3'	5' CAC TCT TGT CTG TTT TAC TAC T 3'

**Tabella 3:** Oligonucleotidi utilizzati per gli esperimenti di *Real time PCR* dei geni *PPARG* ed *ESR2* in *Podarcis sicula*.

### ➤ Ricerca di sequenze

Le sequenze usate in questo lavoro di tesi di Dottorato sono state reperite da due banche dati disponibili in rete, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ed Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Per ottenere informazioni riguardo una specifica banda citogenetica nella quale mappano i geni *PPARG* ed *ESR2* e per osservare, anche tramite un'interfaccia grafica, la presenza di possibili EST o di trascritti alternativi, è stato utilizzato il *software* "Genome Browser-Santa Cruz" (<http://genome.ucsc.edu>),

basato su un algoritmo che permette di trovare, all'interno di numerosi *database* nucleotidici, sequenze omologhe a quella inserita e di visualizzarle graficamente.

Il programma *on-line* permette inoltre di collocare citogeneticamente la sequenza inserita, visualizzando eventuali allineamenti con geni noti o EST, trascritti alternativi degli mRNA corrispondenti, predizioni geniche, omologie tra specie diverse, polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP), ripetizioni (LINE, SINE) e molto altro.

### ➤ **Allineamento di sequenze**

Le sequenze raccolte dalle banche dati, sono state analizzate tramite differenti *software*. Il programma CLUSTAL W permette di allineare sequenze di acidi nucleici o proteine. Gli allineamenti possono essere effettuati tra due sequenze (allineamenti *pair-wise*) oppure tra sequenze multiple. Immettendo delle sequenze in formato fasta, il *software* restituisce le sequenze allineate. Si ottengono così fondamentali informazioni sulle regioni conservate tra le sequenze. Per l'analisi delle sequenze è stato inoltre utilizzato il programma MView, che consente un allineamento multiplo basato su allineamenti *pairwise*. Questo tipo di espediente consente una facilità di lettura e permette di apprezzare e visualizzare zone di particolare conservazione tra la sequenza di riferimento, in questo caso i geni *PPARG* ed *ESR2* identificati in *Podarcis sicula*, e quelle disponibili in banca dati. Anche il programma mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) consente di apprezzare visivamente il rapporto di similarità fra due o più sequenze, a seguito di un allineamento multiplo basato su allineamenti *pairwise* con una data sequenza di riferimento. In questo lavoro di Dottorato mVISTA ha consentito la visualizzazione di regioni particolarmente conservate tra la sequenza dei geni *PPARG* ed *ESR2* di *Podarcis sicula* e l'intera

sequenza genomica di *Anolis carolinensis* rendendo possibile una predizione sulla struttura introne/esone dei geni identificati.

### ➤ **Traduzione di sequenze nucleotidiche**

Per tradurre le sequenze nucleotidiche in sequenze proteiche è stato utilizzato il *software open-source “Virtual Ribosome”* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/VirtualRibosome/>), mentre per la predizione bioinformatica della struttura secondaria della proteina è stato adoperato il programma “*Protein Data Bank*” – PDB - (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>).

### ➤ **“DNA Strider”**

Questo programma permette di visualizzare, all'interno di una sequenza nucleotidica, la presenza di eventuali cornici di lettura aperte (dette ORF, *Open Reading Frame*), di putativi siti di inizio della trascrizione o di siti di arresto. Grazie a questo *software* è inoltre possibile ottenere, a partire da una qualunque sequenza nucleotidica, la “traduzione” nell'ipotetica proteina codificata. Tale operazione consente pertanto di verificare la presenza o meno di cornici di lettura aperte, e quindi di sequenze codificanti una proteina, all'interno delle cosiddette EST (*Expressed Sequence Tags*).

### ➤ **“AutoAssembler”**

Il programma AutoAssembler utilizza un particolare algoritmo che consente di sovrapporre due o più sequenze nucleotidiche mostrando il risultato dell'assemblaggio di esse attraverso una finestra grafica nella quale tutte le sequenze, con un certo grado di omologia, sono allineate tra loro. Questo programma risulta di grande utilità nel



verificare la riuscita di una PCR o di un clonaggio di frammenti nucleotidici proprio perchè permette di allineare le sequenze ottenute mediante sequenziamento automatico con i controlli presenti nei database *on-line*.

## **4. Risultati**

#### 4.1 Identificazione e sequenziamento del gene *PPARG*

Al fine di analizzare il possibile ruolo del gene *PPARG* come fattore pro-apoptotico nella proliferazione cellulare, è stato indispensabile conoscere la sequenza nucleotidica del gene nel modello animale utilizzato in questo studio. Poichè essa non è ancora nota per *Podarcis sicula*, è stato fondamentale il disegno di diverse coppie di oligonucleotidi d'innesco (vedi Materiali e Metodi) al fine di ottenere l'esatta sequenza dell'mRNA.

La prima fase dell'analisi ha previsto un preliminare studio *in silico* delle sequenze del gene *PPARG* in diverse classi di vertebrati. In particolare, lo studio comparativo è stato eseguito sulle sequenze di mRNA ed ha rivelato un'elevata identità nucleotidica, indicando una chiara conservazione di tale gene nella scala evolutiva; tuttavia, per il disegno degli oligonucleotidi sono state selezionate esclusivamente le regioni codificanti (CDS, *Coding DNA Sequence*) di due organismi, il rettile *Eublepharis macularius* (AB360446.1) e l'uccello *Gallus gallus* (NM\_001001460.1), scelti sia in base alla forte vicinanza filogenetica che al maggior grado di identità delle sequenze nucleotidiche. Per amplificare l'intera CDS del gene *PPARG* in *Podarcis sicula* sono stati realizzati, nelle regioni a più elevata identità nucleotidica identificate nella suddetta analisi *in silico*, tre coppie di oligonucleotidi (Figura 23), in modo tale da suddividere la CDS del gene in tre frammenti - tra loro sovrapposti - facilmente clonabili in vettori plasmidici. Dopo l'amplificazione di tali regioni, mediante PCR eseguita sull'RNA isolato da testicolo ed encefalo di *Podarcis sicula*, i tre prodotti di amplificazione sono stati clonati, e successivamente analizzati mediante sequenziamento diretto automatizzato con il metodo di Sanger (Figura 24).

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state allineate tra loro mediante il programma "AutoAssembler" per ricostruire il *full-length* del gene *PPARG* di *Podarcis*

*sicula*. L'intera sequenza del gene è stata allineata mediante BLAST alle sequenze genomiche presenti nelle banche dati, confermando l'identificazione ed il sequenziamento del gene *PPARG* in *Podarcis sicula*. In particolare, l'allineamento con il gene *PPARG* umano ha evidenziato una significativa identità nucleotidica, pari all'83% (Figura 25). Infatti, come già noto in letteratura e già descritto nell'introduzione, esistono domini funzionali molto conservati all'interno della superfamiglia dei recettori nucleari.

La sequenza nucleotidica ottenuta, depositata nella banca dati NCBI (Provisional Accession No.1481500), si estende per 1383 bp e comprende l'ATG d'inizio traduzione (Figura 26).

## **4.2 Identificazione e sequenziamento del gene *ESR2***

Anche per analizzare il gene codificante il recettore ER $\beta$  in *Podarcis sicula* è stato necessario conoscere la sua sequenza nucleotidica. Per il gene *ESR2*, pur essendo disponibile in banca dati un frammento nucleotidico specifico di *Podarcis sicula* (AB482181.1), data la ridotta estensione di tale sequenza (121 bp), è stato indispensabile, per l'identificazione dell'intero gene, avere una sequenza di riferimento completa. Anche in questo caso, è stata utilizzata la sequenza del gene *ESR2* di *Gallus gallus* (NM\_204794.1) per il disegno degli oligonucleotidi d'innescio. Tale scelta è stata effettuata sulla base dell'elevata vicinanza evolutiva tra rettili ed uccelli e, soprattutto, per l'elevata identità nucleotidica tra *Gallus gallus* e *Podarcis sicula* osservata nel clonaggio del gene *PPARG*. La coppia di *primers*, colineari al 100% con il DNA genomico di *Gallus gallus* (vedi Materiali e Metodi) ha consentito, nella prima fase del clonaggio, di amplificare una porzione centrale del gene *ESR2*, che comprende i domini maggiormente conservati della superfamiglia dei recettori nucleari: il dominio di

legame al DNA (DBD) e quello di legame al ligando (LBD), poiché, come è stato già trattato nell'introduzione, il gene *ESR2* ha una scarsa conservazione nucleotidica nelle regioni al 5' ed al 3' lungo la scala evolutiva (Figura 27).

Al fine di ottenere una discreta quantità di materiale genetico da sequenziare ed un'elevata purezza nel campione, il prodotto di amplificazione ottenuto mediante PCR ( $\approx 780$  coppie di basi), è stato prima clonato in un vettore plasmidico ed infine sequenziato (Figura 28). La sequenza nucleotidica ottenuta è stata allineata alle sequenze nucleotidiche presenti nelle banche dati genomiche mediante BLAST, confermando l'amplificazione in *Podarcis sicula* della regione centrale del gene *ESR2*. Il sequenziamento di tale frammento del gene *ESR2*, relativo alla porzione centrale dell'intero trascritto, è stato fondamentale per il disegno di altre due coppie di oligonucleotidi a monte e a valle del frammento stesso. In questo caso, conoscendo la parte centrale della sequenza nucleotidica del trascritto, è stato possibile disegnare due coppie di inneschi specifici per *Podarcis sicula* (*primer reverse* al 5' e *primer forward* al 3'). Invece, per le regioni alle estremità 5' e 3' del gene (*primer forward* al 5' e *primer reverse* al 3'), si è utilizzato come riferimento il genoma di *Gallus gallus* e quello del rettile *Elaphe quadrivirgata* (AB548297.1) (Figura 29).

I *primers* così disegnati hanno consentito l'amplificazione di due bande che, una volta purificate, sono state clonate in vettori plasmidici, e successivamente sequenziate (Figura 30). Le due sequenze sono state corrette ed allineate prima tra loro e successivamente assemblate alla sequenza precedentemente ottenuta relativa ai due domini DBD ed LBD, al fine di ottenere il *full-length* dell'mRNA del gene *ESR2* in *Podarcis sicula*.

L'intero trascritto di 1522 bp (Provisional Accession No. 1482266) (Figura 31) è stato allineato mediante BLAST alle sequenze genomiche di diverse specie,

confermando l'identificazione in *Podarcis sicula* del gene *ESR2*, codificante il recettore ER $\beta$ , che mostra un'identità nella sequenza nucleotidica del 73% con il gene *ESR2* di *Homo sapiens* (Figura 32).

### 4.3 Analisi bioinformatica ed evolutiva del recettore PPAR $\gamma$

Nella prima parte di questo Progetto di Dottorato sono state raccolte le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche di diversi vertebrati presenti nelle banche dati genomiche per eseguire studi di comparazione tra il gene *PPARG* di *Podarcis sicula* e le sequenze ortologhe, ed individuare le regioni più conservate tra le varie specie (Tabella 4).

Tale analisi ha mostrato l'elevata identità della sequenza nucleotidica, notoriamente meno conservata rispetto alla sequenza amminoacidica, per tutte le specie prese in esame. La conservazione nucleotidica con gli organismi appartenenti allo stesso ordine, e quindi filogeneticamente vicini, come la lucertola *Anolis carolinensis* (XM\_003217673.1), il gecko *Eublepharis macularius* (AB360446.1) e la tartaruga *Trachemys scripta elegans* (AJ243133.1) si è rivelata, come atteso, molto elevata, rispettivamente dell'89%, dell'88% e dell'87%. A seguire, tra gli Uccelli, l'oca selvatica *Anser anser* (AF481798.1), il Germano reale *Anas platyrhynchos* (EF546801.2) ed il gallo *Gallus gallus* (NM\_001001460.1), tutti con un'identità nucleotidica dell'85%. È interessante notare come, nonostante la posizione divergente nella scala evolutiva del rettile *Podarcis sicula* dai primati, la sequenza nucleotidica del gene *PPARG* sia fortemente conservata; essa risulta infatti dell'83% per *Homo sapiens* (HQ692866.1) e scimpanzé *Pan troglodytes* (XM\_001153669.2) e dell'81% per i roditori *Rattus norvegicus* (NM\_013124.3) e *Mus musculus* (NM\_001127330.1).

L'analisi bioinformatica sulla conservazione nucleotidica del gene tramite BLAST e gli aspetti filogenetici di tale sequenza (NCBI E Jalview, Figura 33), hanno evidenziato che la più alta, seppur diversa, conservazione nucleotidica per l'intera CDS del gene *PPARG* di *Podarcis sicula* si riscontra principalmente in tre differenti classi di vertebrati: quella dei Rettili, degli Uccelli e dei Mammiferi, come mostrato in Figura 34.

Una delle tappe fondamentali per il confronto tra sequenze consiste nell'allineamento delle stesse: utilizzando il programma CLUSTAL W è stato pertanto eseguito un allineamento multiplo tra le sequenze degli mRNA del gene *PPARG* in diversi organismi. Considerando la presenza ricorrente delle tre classi di vertebrati, per gli allineamenti nucleotidici ed amminoacidici sono state prese in esame due specie per ogni organismo appartenente alle suddette classi (Figure 35 e 36). Negli allineamenti la conservazione di una base in una determinata posizione è indicata dall'asterisco sottostante. Si può osservare come sia mantenuta una buona conservazione per tutta la lunghezza delle sequenze esoniche e aminoacidiche: la presenza di regioni molto conservate corrisponde alla presenza di zone funzionali che sono rimaste immutate durante l'evoluzione. Per l'analisi delle sequenze nucleotidiche è stato inoltre utilizzato il programma MView, che permette un allineamento considerato di tipo multiplo ma che in realtà si basa su allineamenti *pairwise*. Questo consente una facilità di lettura e permette di apprezzare e visualizzare regioni di particolare conservazione tra la sequenza di riferimento, in questo caso il gene *PPARG* di *Podarcis sicula*, e quelle disponibili in banca dati: gli allineamenti sono posizionati l'uno sotto l'altro in modo da poter individuare facilmente se le regioni conservate in ciascuna coppia sono conservate anche nelle altre specie (Figura 37).

L'allineamento tramite BLAT (UCSC, *University of California, Santa Cruz*) dell'mRNA di *Podarcis sicula* vs il DNA genomico del gene *PPARG* di diversi vertebrati ha confermato la presenza di tutti i sei esoni codificanti il gene anche nella sequenza identificata in *Podarcis sicula*. In particolare, l'mRNA del gene *PPARG* di *Anolis Carolinensis* è risultato essere il trascritto a più elevata omologia di sequenza con quello identificato in *Podarcis sicula* nel corso di questo Dottorato di Ricerca (Figura 38), pertanto, tale trascritto, è stato utilizzato come base di partenza per ricostruire l'esatta struttura introne/esone del gene *PPARG* in *Podarcis sicula*.

Nello specifico, è stata valutata, dopo aver allineato la CDS sequenziata del gene *PPARG* di *Podarcis sicula* con il DNA genomico di *Anolis carolinensis* - annotato in UCSC - la presenza di due sequenze nucleotidiche fondamentali per lo *splicing* degli esoni, ovvero le *consensus* per il riconoscimento dello *spliceosoma*, 5'-GT e AG-3', localizzate al 3' e 5' dell'introne. Tali sequenze, definite donatore e accettore di *splicing*, definiscono il "confine" tra le regioni esoniche ed introniche, e sono pertanto utili per la predizione dell'esatta struttura introne/esone dei geni. Dal punto di vista pratico, l'intera sequenza del gene *PPARG* è stata allineata con lo scaffold\_chr2:158830173-158864504 di *Anolis carolinensis*. Una rappresentazione grafica, mediante mVISTA, è mostrata in Figura 39, dove è evidente l'alta percentuale di identità (100%) e la conservazione dei sei esoni codificanti il gene *PPARG* di *Podarcis sicula*. L'allineamento ha rivelato un'elevatissima conservazione delle sequenze 5'-GT e AG-3', consentendo di predire in maniera accurata l'esatta struttura introne/esone del gene *PPARG* in *Podarcis sicula* (Figura 40).

Infine, mediante l'utilizzo dei *software open-source* "Virtual Ribosome" (<http://www.cbs.dtu.dk/services/VirtualRibosome/>) e "Protein Data Bank" – PDB - (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) è stato possibile tradurre la sequenza



nucleotidica dell'mRNA *full-length* di *PPARG* in quella amminoacidica, ottenendo una predizione bioinformatica della struttura secondaria della proteina codificata dal gene *PPARG* in *Podarcis sicula*, costituita da 461 residui amminoacidici (Figura 41 e Figura 42).

#### **4.4 Analisi bioinformatica ed evolutiva del recettore ER $\beta$**

La comparazione tra la sequenza amminoacidica e quella dell'mRNA del gene *ESR2* in *Podarcis sicula*, sequenziato *ex novo* nel corso di questo lavoro di Dottorato, con quelle presenti nelle banche dati genomiche è mostrata in Tabella 5.

Sebbene la più alta conservazione nucleotidica per l'intera CDS del gene *ESR2* di *Podarcis sicula* si riscontri maggiormente tra i Rettili (cui seguono gli Uccelli ed i Mammiferi), l'analisi dei dati ottenuti mediante BLAST e del conseguente albero filogenetico (NCBI e Jalview Figura 43) ha evidenziato una conservazione, seppure minore, anche con la sequenza del gene *ESR2* di alcuni Anfibi, come *Rana rugosa* (FJ828859.1) e *Xenopus (Silurana) tropicalis* (NM\_001040012.1), entrambi con il 70% di identità nucleotidica (Figura 44). Gli allineamenti multipli, nucleotidici ed amminoacidici, tra le sequenze del gene *ESR2* di *Podarcis sicula* e le sequenze presenti nelle banche dati, sono riportati nelle figure 45-47. In questo caso, risulta evidente una minore conservazione evolutiva nelle regioni al 5' ed al 3' del gene *ESR2*, come ampiamente evidenziato in letteratura. L'analisi di numerosi membri della famiglia dei recettori nucleari ha infatti indicato come la presenza di più promotori nella regione al 5' del gene sia una caratteristica comune dei recettori per gli ormoni sessuali steroidei. Nell'uomo, inoltre, l'inclusione nel trascritto maturo dell'ottavo esone determina l'esistenza di diverse isoforme del gene *ESR2* che divergono tutte nella regione al 3'.

In generale, il recettore ER $\beta$  con le sue molteplici isoforme varia da specie a specie, suggerendo un ulteriore livello di complessità alla segnalazione mediata dagli estrogeni; tuttavia, è evidente una significativa conservazione lungo la scala evolutiva per i domini di legame al DNA e al ligando. Questo, infatti, giustifica e motiva la scelta di un clonaggio condotto a partire dall'amplificazione di un tratto centrale del gene *ESR2*, come descritto in precedenza.

L'allineamento mediante BLAT dell'mRNA di *ESR2* di *Podarcis sicula* vs il DNA genomico del gene *ESR2* di diversi vertebrati ha confermato la chiara presenza degli otto esoni codificanti il gene in esame. Anche in questo caso, il trascritto a più elevata omologia di sequenza è risultato essere quello del gene *ESR2* di *Anolis Carolinensis*. In maniera analoga a quanto descritto per il gene *PPARG*, tale mRNA è stato utilizzato come base di partenza per determinare la struttura introne/esone del gene *ESR2* in *Podarcis sicula* : in particolare, la CDS è stata allineata con lo scaffold\_chr1:1646554-1678968 di *Anolis Carolinensis* presente nella banca dati UCSC per l'analisi delle sequenze *consensus* per il riconoscimento dello *spliceosoma*, 5'-GT e AG-3'. Tale analisi ha mostrato che, anche per il gene *ESR2*, le sequenze dei siti di *splicing* sono estremamente conservate (Figura 48).

L'allineamento tramite mVISTA tra la sequenza del gene *ESR2* di *Podarcis sicula* e la sequenza genomica di *Anolis Carolinensis* è rappresentata in Figura 49, dove è visibile la percentuale di identità (100%) e la conservazione degli esoni: ciò ha consentito di predire la struttura introne/esone del gene *ESR2* in *Podarcis sicula* (Figura 50). Infine, con il software “*Virtual Ribosome*” e “*Protein Data Bank*” è stato possibile ottenere una predizione bioinformatica della sequenza amminoacidica e della conformazione strutturale del peptide ER $\beta$  in *Podarcis sicula*, costituito da 507 residui amminoacidici (Figura 51 e Figura 52).

#### 4.5 Analisi di espressione del gene *PPARG* nel ciclo riproduttivo

Dopo aver clonato il trascritto completo del gene *PPARG*, è stata misurata, mediante *Real-Time* quantitativa, la sua espressione relativa nelle tre diverse fasi del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*, in due diversi tessuti: testicolo ed encefalo. È stato scelto di eseguire l'analisi d'espressione di questo gene in questi tessuti data l'importanza che il gene *PPARG* riveste nella proliferazione cellulare, e nella spermatogenesi in particolare, al fine di valutare l'eventuale impatto di esso sul *cross-talk* "encefalo-gonadico".

Tale analisi, condotta in triplicato e su tre diversi esemplari di *Podarcis sicula*, ha rivelato che sia nell'encefalo che nel testicolo, l'espressione relativa (normalizzata col gene *house-keeping* codificante l'rRNA 12S) di tale trascritto subisce un progressivo aumento nei tre diversi periodi del ciclo riproduttivo, con livelli più bassi nel periodo della stasi invernale, fino a più elevati livelli d'espressione genica nella fase refrattaria. Le Figure 53 e 54 mostrano nel dettaglio, per entrambi i tessuti di *Podarcis sicula* analizzati, i livelli di espressione relativa. Nei tessuti analizzati, l'espressione dell'mRNA del gene *PPARG* in *Podarcis sicula* risulta significativamente ridotta nei mesi corrispondenti al periodo di stasi invernale, con un progressivo aumento della sua espressione nei mesi corrispondenti alla fase riproduttiva.

Poichè il recettore  $PPAR\gamma$  è coinvolto in diversi ed importanti processi metabolici cellulari, tale risultato suggerisce che il notevole aumento della trascrizione del gene *PPARG* in questa fase sia correlato all'aumento della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, fondamentale per il rifornimento di carburante metabolico indispensabile a sostenere il fenomeno della "capacitazione", che comporta notevoli alterazioni del metabolismo nemaspermico. Durante tale processo, infatti, la richiesta energetica

aumenta considerevolmente, ed il recettore PPAR $\gamma$  potrebbe agire da “strumento molecolare” in grado di regolare e di contenere l’eccessiva dissipazione energetica.

Nel periodo refrattario di *Podarcis sicula*, l’encefalo esprime il gene *PPARG* a livelli circa sette volte maggiori rispetto al periodo riproduttivo, mentre il testicolo a livelli circa il doppio rispetto a quanto misurato durante l’attiva spermatogenesi. La marcata sovra-espressione del gene *PPARG* durante la fase refrattaria suggerisce fortemente, anche in *Podarcis sicula*, un ruolo anti-proliferativo (e pro-apoptotico) di tale recettore, con conseguente blocco della proliferazione cellulare ed estesa degenerazione delle cellule seminali, che si osservano in questa fase del ciclo riproduttivo.

#### **4.6 Analisi di espressione del gene *ESR2* nel ciclo riproduttivo**

In maniera analoga a quanto descritto in precedenza per il gene *PPARG*, mediante *Real Time* PCR quantitativa sono stati misurati - nei diversi periodi del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*, sia nel testicolo che nell’encefalo – i livelli d’espressione del gene *ESR2*, per valutare il possibile effetto inibitorio di tale gene sulla proliferazione cellulare, come suggerito da numerosi dati di letteratura.

L’analisi mediante *Real-time* ha evidenziato un andamento decrescente dell’espressione del gene *ESR2* nell’encefalo di *Podarcis sicula*, da valori elevati nel periodo di stasi riproduttiva fino ad un blocco completo della sua espressione nel periodo refrattario (il rapporto dell’espressione relativa del gene è 2:1:0, stasi, riproduttivo, refrattario, rispettivamente) (si veda Figura 55).

Nel testicolo, sede della spermatogenesi, invece i livelli di espressione relativa del gene *ESR2* mostrano un andamento a campana: il gene è infatti espresso ad elevati livelli durante l’attiva spermatogenesi, perfettamente in linea con la principale funzione

riproduttiva svolta dall'ormone E<sub>2</sub>, mentre nel periodo di stasi e in quello refrattario, l'espressione del gene tende a diminuire in maniera sensibile (Figura 56).

I risultati degli esperimenti di *Real-Time* evidenziano, nella fase refrattaria del ciclo riproduttivo, caratterizzata da alte concentrazioni di E<sub>2</sub>, bassi livelli d'espressione del gene *ESR2*, molto probabilmente associati ad un'interruzione della segnalazione estrogenica che, in questo caso, si accompagnano ad una sovra-espressione del gene *PPARG*, descritta nel paragrafo precedente (*cross-talk* negativo tra i due recettori nucleari). Invece, l'elevata espressione del gene *ESR2* sia nel testicolo che nell'encefalo di *Podarcis sicula* in piena fase riproduttiva, ovvero quando entra in funzione il sistema di regolazione endocrina, conferma l'importante ruolo fisiologico degli estrogeni sui processi riproduttivi ed, in particolare, durante l'attiva spermatogenesi dell'animale in esame. L'interazione tra asse riproduttivo e bilancio energetico suggerisce, inoltre, un ruolo cruciale dell'ormone E<sub>2</sub> anche nella regolazione del metabolismo nemaspermico.

#### **4.7 Espressione dei geni *PPARG* ed *ESR2* nel ciclo riproduttivo**

L'analisi del profilo d'espressione dei geni *PPARG* ed *ESR2* in *Podarcis sicula*, ha evidenziato, in tutti gli esperimenti condotti, una correlazione negativa tra i loro livelli di espressione, confermando i dati presenti in letteratura sull'effetto reciprocamente inibitorio che essi esercitano nel *pathway* di sopravvivenza cellulare.

La quantificazione relativa dei livelli di espressione dei due geni eseguita nei diversi periodi del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula* evidenzia come, in entrambi i tessuti analizzati, un aumento dell'espressione del gene *PPARG* correli in maniera significativa con una drastica riduzione nell'espressione del gene *ESR2*, e viceversa.

L'analisi comparativa tra i livelli d'espressione di questi due geni, tessuto per tessuto, ha mostrato interessanti risultati.

Nell'encefalo, i livelli d'espressione relativa del gene *PPARG* tendono gradualmente ad aumentare nel corso del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*, mentre quelli del gene *ESR2* decrescono in maniera costante, fino ad essere non più misurabili nella fase refrattaria. Mentre nel periodo di stasi invernale i livelli d'espressione misurati sono bassi per entrambi i geni analizzati, nel periodo riproduttivo l'espressione del gene *PPARG* è circa 5 volte maggiore rispetto al gene *ESR2*. Tale discrepanza tra i livelli d'espressione aumenta nella fase refrattaria del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*, dove, almeno nell'encefalo, i valori d'espressione di *PPARG* sono circa 40 volte maggiori rispetto al gene *ESR2*, che non risulta misurabile mediante *Real-Time* quantitativa, e pertanto può essere considerato non espresso (Figura 57). Nel testicolo, invece, durante le fasi di stasi e di attiva spermatogenesi, l'espressione del gene *ESR2* è sempre più elevata rispetto al gene *PPARG* ma, anche in questo tessuto, l'espressione del gene *PPARG* nel periodo refrattario è almeno 4 volte superiore rispetto al gene *ESR2* (Figura 58). I meccanismi molecolari attraverso i quali tali recettori nucleari sono in grado di interagire reciprocamente sono numerosi e comprendono: (a) l'utilizzo di elementi di risposta in comune, come nel caso dei recettori degli androgeni, i recettori per i gluco- e mineral-corticoidi ed i recettori del progesterone (Parker, 1993), (b) l'eterodimerizzazione di RXR con diversi *partner* proteici (Stunnenberg, 1993) e (c) associazioni con classi di fattori di trascrizione e/o altri componenti della segnalazione cellulare situati a livello della membrana (Miner and Yamamoto, 1991; Martinez *et al.*, 1991). Le possibili cause di tale *cross-talk* negativo sono discusse in maggior dettaglio nella Discussione.

#### 4.8 Analisi *in silico* dei geni *PPARG* ed *ESR2*

Contemporaneamente agli studi molecolari effettuati sulla spermatogenesi dell'organismo modello *Podarcis sicula*, è stata eseguita un'estesa analisi bioinformatica nel genoma umano per verificare la presenza di eventuali trascritti alternativi nelle regioni genomiche corrispondenti ai geni *PPARG* e *ESR2*.

L'analisi bioinformatica, condotta mediante la consultazione del visualizzatore genomico ad interfaccia grafica "*Genome Browser*", ha mostrato la presenza di una EST (*Expressed Sequence Tag*) - potenziale trascritto alternativo - nella regione genomica (14q23.2) corrispondente al gene *ESR2* (BF510841) (Figura 59). Tuttavia, i dati molecolari ottenuti dall'analisi di tale nuovo eventuale trascritto del gene *ESR2*, sono ancora oggetto di analisi e non rientrano, pertanto, in questo lavoro di Dottorato.

Per quanto riguarda il gene *PPARG*, invece, tale analisi ha permesso l'identificazione - nella regione 3p25.2 - di tre EST. Le EST sono delle vere e proprie "etichette" corrispondenti (o meglio associate) ad una specifica sequenza espressa, ovvero un trascritto, e sono costituite generalmente da piccole sequenze parziali di cDNA di 100-300 nucleotidi. Le tre EST presenti nella regione genomica 3p25.2, (BI524663, CB132672 e CA426975), isolate rispettivamente da una libreria di cDNA di polmone, una linea cellulare di fegato ed una di osso sub-condrale, hanno permesso di identificare un nuovo trascritto del gene *PPARG*, derivante da un evento di *splicing* alternativo. Tale nuovo trascritto, denominato " $\gamma\Delta 5$ " è generato da un chiaro evento di *skipping* – salto - dell'esone 5 del gene umano *PPARG* (Figura 60).

Come dimostrato dall'analisi bioinformatica, dal punto di vista proteico, la perdita di tale esone corrisponderebbe alla perdita dell'intero dominio di legame al ligando, mentre il dominio di legame al DNA e il dominio di eterodimerizzazione restano intatti.

Tuttavia, il suo impatto sulla proteina è stato valutato esclusivamente mediante approcci *in silico*, saranno pertanto necessari ulteriori studi molecolari e biochimici per comprenderne l'esatta espressione tissutale, l'effettiva produzione di una proteina alterata, nonché il suo potenziale ruolo nei processi di tumorigenesi nell'uomo.

#### **4.9 Identificazione e caratterizzazione di una nuova isoforma del gene *PPARG* in tessuti tumorali**

La presenza di tale nuovo trascritto è stata verificata mediante RT-PCR semiquantitativa sia in tessuti normali che in tessuti tumorali.

I cDNA utilizzati per valutare la presenza di questo nuovo trascritto del gene *PPARG*, identificato a partire dall'analisi di EST, sono stati ottenuti per retrotrascrizione partendo da RNA estratto da tessuti normali e tumorali di colon, già presenti nel laboratorio del Prof. Ciccodicola. È stata quindi valutata l'espressione del recettore PPAR $\gamma$  utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifica per l'amplificazione dell'intera regione codificante del gene *PPARG*, comune a tutte le isoforme conosciute ( $\gamma$ 1-4). Come è mostrato in Figura 61, oltre alla banda attesa di 1600 bp, corrispondente alla forma già nota del gene *PPARG*, è stata evidenziata, in corrispondenza del campione di tessuto tumorale, una seconda banda di peso molecolare inferiore, di circa 1000-1100 bp, ovvero quasi 500bp più corta di quella attesa. I prodotti di amplificazione sono stati pertanto estratti dal gel di agarosio, purificati e sequenziati mediante sequenziamento automatico. Il prodotto di amplificazione di circa 1600bp, come atteso, è risultato corrispondere agli esoni 1-6 del gene *PPARG*. Il prodotto di amplificazione più piccolo, invece, corrisponde ad un trascritto di 1122 bp: allineando la nuova sequenza con il gene *PPARG* è stato possibile verificare che tale trascritto è



perfettamente identico al classico trascritto *full-length* del gene *PPARG*, ma manca di 451 bp corrispondenti all'intero esone 5 (Figura 62).

E' stata quindi confermata l'esistenza di un nuovo trascritto del gene *PPARG*, generato mediante un meccanismo di "skipping" esonico a carico dell'esone 5. In questo caso, lo "skipping" dell'intero esone 5 altera la cornice di lettura, determinando l'introduzione di un codone di stop prematuro nell'esone 6. Da un preliminare studio di predizione bioinformatica, è infatti emerso che la traduzione proteica di tale nuovo trascritto determinerebbe la produzione di un recettore nucleare più corto, con la perdita completa del dominio di legame al ligando (LBD) (Figura 63).

Per analizzare se l'espressione della nuova isoforma del gene *PPARG* identificata ( $\gamma\Delta 5$ ) fosse caratteristica del solo tessuto del colon, si è valutata la sua espressione, unitamente a quella del trascritto  $\gamma\text{ORF4}$  utilizzato come controllo, in un diverso gruppo di tessuti umani. A questo scopo sono stati selezionati una serie di mRNA, disponibili in laboratorio, da cui sono stati retrotrascritti i cDNA corrispondenti. Il pannello tissutale così realizzato comprende cDNA ricavati da cervello, rene, cuore, carcinoma ovarico, placenta, fegato (sia sano che tumorale, HepG2), tiroide, muscolo scheletrico e linea cellulare di monociti (U937). Come si può osservare in Figura 64, il trascritto  $\gamma\text{ORF4}$  è abbastanza espresso in campioni di epatocarcinoma ma non di fegato normale, in rene, in cuore, a livello della placenta, in carcinoma ovarico e nei monociti; il trascritto  $\gamma\Delta 5$ , invece, presenta un profilo d'espressione che ricalca quello dell'isoforma  $\gamma\text{ORF4}$  ma con livelli relativi più bassi.

Tale isoforma è quindi normalmente espressa anche in altri tessuti, sia normali che tumorali, suggerendo che essa potrebbe svolgere differenti ruoli, fisiologici o patologici, in diversi tipi cellulari o tessuti, ed avere così uno o più funzioni cellulari ancora sconosciuti.

E.macularius ATGGTTGACACAGAAATGCCGTTTGGTCCGTAACCTTGGAAATAGCCCACTGGACCTT 60  
 G.gallus ATGGTTGACACAGAAATGCCGTTTGGTCCGTTAATTTGGAAATAGCCCACTGGACCTT 60

E.macularius TCTGCAATGGACGATCACTCCCATTCCTTTGACATAAAGCCTTTTACCACAGTTGATTTT 120  
 G.gallus TCTGCGATGGATGATCATATGCATTCTTTGACATAAAGCCTTTTACCACAGTTGATTTT 120

E.macularius ACCAGTCTTCTCACCACATATGAAGATCTTCTCTCACAAGAAGTACCAGACAGCA 180  
 G.gallus TCAAGCATTTCTCACCACATATGAAGATATACCTCTTGGAAAGAGCTGATCAACAAG 180

E.macularius ATTGATTACAAATATGATATGAACTTCAAGAGTGCCAAAGTGAATCAAGATGGAGCC 240  
 G.gallus ATTGATTATAATATGATATCAAGCTCAGGATTGCCAAAGTGAATCAAAATGGAGCT 240

E.macularius CCCTCTCCACCTACTTCTCAGAAAAGTTCAGCTGTACAATAAGCTCATGAAGAAGCT 300  
 G.gallus CCCTCTCTCCCTATTTTCTGAAAAGTGCAGTTATACAATAAACCTCACGAGGAGCT 300

E.macularius TCCAGTTCTCTAATGGCTATTGAATGCAGGGTGTGCGGAGACAAGCTTCTGGGTTTCAT 360  
 G.gallus TCCAACCTCACTTATGGCTATTGAATGCTGTGTGTTGGGACAAGGCTCTGGATTTTCAT 360

E.macularius TACGGAGTGCATGCATGTGAAGGCTGAAGGGTTCTTTGGAAGAACAATCCGGTTAAAG 420  
 G.gallus TATGGAGTGCATGCATGTGAAGGTTGAAGGGCTTTTTCGAAGAACAATCAGATTTAAAG 420

E.macularius TTAAATATGATAGATGTGAGCTCAACTGTGCAATTGATAAGAAAAGCAGAAATAAATGT 480  
 G.gallus CTATTTATGATAGGTGTGACCTTAATTGTCGATCCATAAGAAAAGCAGAAATAAGTGT 480

E.macularius TAGTACTGCAGATTCAGAAATGTCTTGCAAGTGAATGTACATAATGCCATTAGGTT 540  
 G.gallus CATACTGCAGATTCAGAAATGTCTTGCAAGTGAATGTACATAATGCCATTAGGTT 540

E.macularius GGAAGAATGCCACAAGCTGAAAAGGAGAAGCTCTTGGCAGAGATTTCAGCGACATCGAC 600  
 G.gallus GGGCGAATGCCACAAGCGAGAAGGAGAAGCTCTTGGCAGAGATTTCAGCGACATCGAC 600

E.macularius CAGCTAAATCCTGAGTCTGCTGATCTGAGAGCCCTGCCAAGCTCTGTATGATTCATAC 660  
 G.gallus CAGTTAAATCCTGAATCTGCTGATCTGCGAGCGCTTGCCAAGCATTTGTATGATTCATAC 660

E.macularius ATAAAGCTCTCCCTCTGACAAAAGCCAAGGCGAGGCAATCTTGACGGGAAAGACAACA 720  
 G.gallus ATAAAGCTCTCCCGCTGACAAAAGCCAAGGCGAGGCAATCTTGACAGGAAAGACGACA 720

E.macularius GACATATCACCATTGTGCTATTATGACATGAATTCCTTAATGATGGGTGAAGACAGATC 780  
 G.gallus GACAAATCACCATTGTGCTATTATGACATGAATTCCTTAATGATGGGTGAAGACAGATC 780

E.macularius AAGTGCAAAATCTGACCCCATGCAAGAGCAGAACAAAGAGGTAGCCATTTGCATCTTC 840  
 G.gallus AAGTGTAAGCATGCATCACCCTGCAAGAGCAGAACAAAGAGGTAGCAATTCGATTTTC 840

E.macularius CAGCGTGTGAGTTTCGCTCAGTAGAAGCTGTTCCAGGAGATCAGAAATTTGCCAAAAGC 900  
 G.gallus CAGCGATGTGAGTTTCGCTCAGTAGAAGCTGTTCCAGGAGATCAGAAATTTGCCAAAAGC 900

E.macularius ATTCCAGGCTTTGTGAGCCTAGACCTGAATGACCAAGTAACCTCTCTGAAATATGGTGT 960  
 G.gallus ATTCCAGGTTTGTGAAATCTTGACCTGAATGATCAGGTAACCTCTCTGAAATATGGTGT 960

E.macularius CACCAAAATCATCTATACGCTGCTGGCCTCCATGATGAATAAGACGGTGTCTCATTTCA 1020  
 G.gallus CTGAGATCATATATACTCTCTGGCTTCTCATGAATAAGATGGAAGTTCTTATATCT 1020

E.macularius AATGGACAAGGATTCATGACTCGGGAGTTTAAAGAGTCTGCGGAAACCTTTTGTGAC 1080  
 G.gallus GATGGACAAGGATTCATGACACGGGAGTTTCTGAAGAGTCTGAGAAAACCTTTTGTGAC 1080

E.macularius TTATGGAGCCCAAGTTTGAGTTTGTCTGCAAAATCAATGCACTGGAAGTAGATGACAG 1140  
 G.gallus TTATGGAGCCCAAGTTTGAGTTTGTCTGCAAAATCAATGCACTGGAAGTAGATGACAG 1140

E.macularius GATTTGGCAATATTTATAGCGCTCATTATACTCAGTGGAGATCGCCCTGGATTACTGAA 1200  
 G.gallus GACCTGGCAATATTTATAGCTGCTATTATACTAAGTGGAGATCGCCAGGTTTGTAAAT 1200

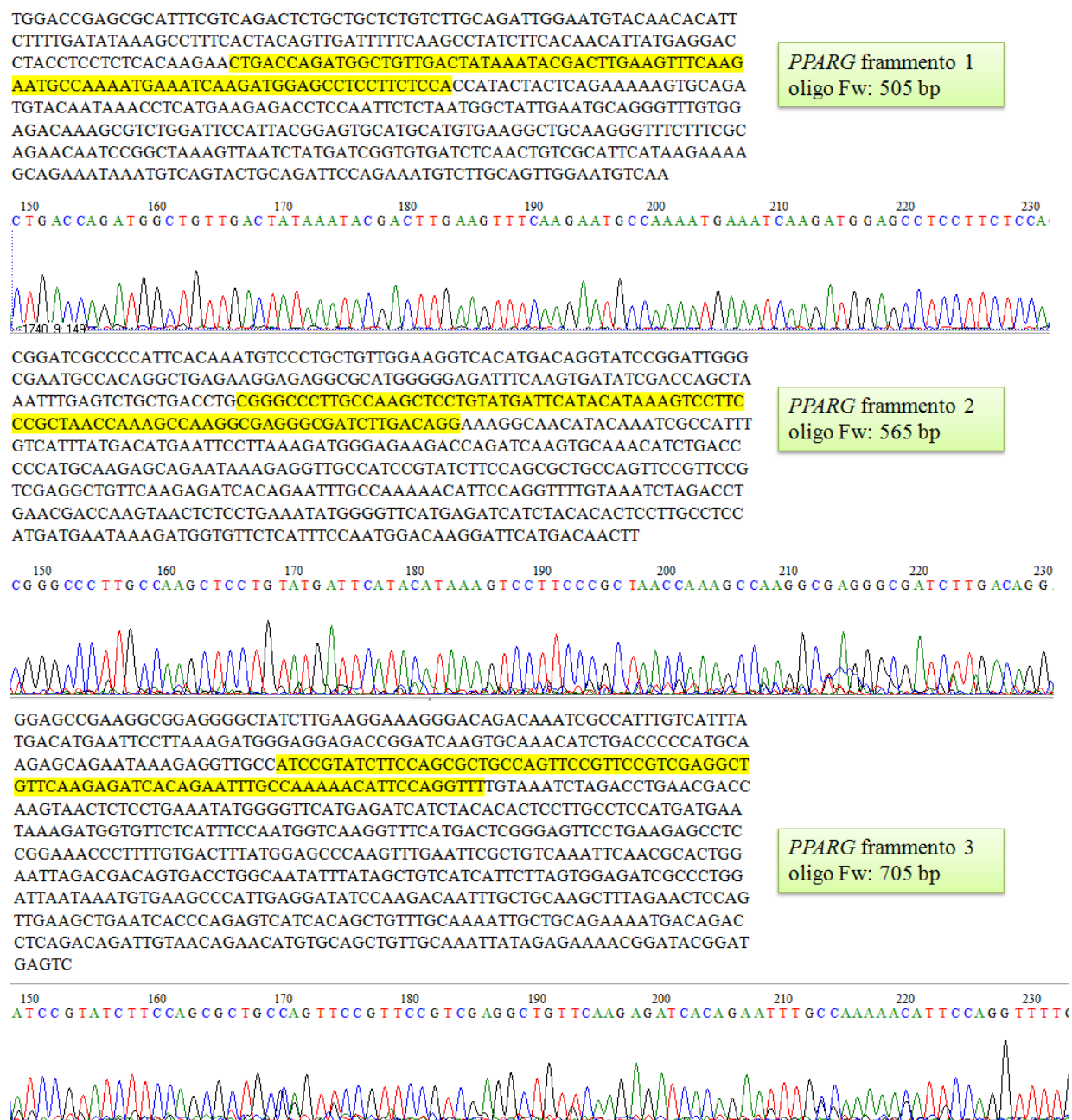
E.macularius GTGAAGCCCATTTGAAGACATACAAGACAATTTGCTGCAAGCTTTAGAACTCCAGTTAAAG 1260  
 G.gallus GTGAAGCCCATTTGAAGATATACAAGATAATCTGTTGCAAGCTTTGAGCTCCAGCTAAAG 1260

E.macularius CTGAATCATCTGAAATCTCACAGCTGTTTGCAAAATGCTGCAGAAAATGACAGATCTG 1320  
 G.gallus CTGAATCATCCAGAGTCATCACAGCTGTTTGCAAAATGCTTCAGAAAATGACGGACCTG 1320

E.macularius AGACAGATTGTAACGGAGCAGCTGACAGCTGTTGCAAAATCATAAGAAAACGGAGACAGAT 1380  
 G.gallus AGACAAATTTGAACGGAAACAGCTGACAGCTGTTGCAAAATCATAAGAAAACGGAAACAGAT 1380

E.macularius ATGAGCTTTATCCACTCTTAACAAGAAAATTTACAAGGACTTGTATTAA 1431  
 G.gallus ATGAGCTTTATCCACTCTTAACAAGAAAATTTACAAGGACTTATATTAA 1428

**Figura 23:** Allineamento *pairwise* tra le regioni codificanti del gene *PPARG* di *G.gallus* ed *E.macularius*, mediante il programma CLUSTAL W. La CDS è stata suddivisa in tre regioni sovrapposte, indicate dalle cornici colorate, per il disegno di tre diverse coppie di oligonucleotidi per amplificare il gene *PPARG* in *P.sicula*.



**Figura 24:** Estrapolazione delle sequenze ottenute dalle singole PCR con gli oligonucleotidi forward (Fw) e dei relativi elettroferogrammi del gene *PPARG* in *Podarcis sicula*. Le parti evidenziate in giallo corrispondono al tratto di elettroferogramma riportato in basso.



P.sicula	ATGGTTGACACAGAAATGCCGTTTTGGCCCATGAACCTTTGGAATTAGCCCAGTGGACTTC	60
H.sapiens	ATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCACCAACTTTGGGATCAGCTCCGTGGATCTC	60
	***** * * * * *	
P.sicula	TCTGGGATGGATGAACACTCACATTCTTTTGATATAAAGCCTTTCACTACAGTTGATTTT	120
H.sapiens	TCCGTAATGGAAGACCACTCCCACTCCTTTGATATCAAGCCCTTCACTACTGTTGACTTC	120
	** * * * * *	
P.sicula	TCAAGCCTTTCTTCACAACATTATGAGGACCTTCCTCCTCTCACAAGAAGTACCAGATG	180
H.sapiens	TCCAGCATTTCTACTCCACATTACGAAGACATTCC--ATTCAACAAGAAGATCCAGTG	177
	** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	GCTGTTGACTATAAATACGACTTGAAGTTTCAAGAATGCCAAATGAAATCAAGATGGAG	240
H.sapiens	GTTGCAGATTACAAGTATGACCTGAACTTCAAGAGTACCAAGTGCATCAAAGTGGAG	237
	* * * * * * * * * * * *	
P.sicula	CCTCCTTCTCCACCATACTACTCAGAAAAAGTGCAGATGTACAATAAACCTCATGAAGAG	300
H.sapiens	CCTGCATCTCCACCTTATTATTCTGAGAAGACTCAGCTCTACAATAAGCCTCATGAAGAG	297
	*** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	ACCTCCAATTCTCTAATGGCTATTGAATGCAGGGTTTGTGGAGACAAAGCGTCTGGATT	360
H.sapiens	CCTTCCAACCTCCCTCATGGCAATTGAATGTCGTGTCTGTGGAGATAAAGCTTCTGGATT	357
	* * * * * * * * * * * *	
P.sicula	CATTACGGAGTGCATGCATGTGAAGGCTGCAAGGGTTTCTTCGCAGAACAAATCCGGCTA	420
H.sapiens	CACATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTTTCTTCGGAGAACAAATCAGATTG	417
	** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	AAGTTAATCTATGATCGGTGTGATCTCAACTGTCGCATTTCATAAGAAAAGCAGAAATAAA	480
H.sapiens	AAGCTTATCTATGACAGATGTGATCTTAAGTGTGCGATCCACAAAAAAGTAGAAATAAA	477
	*** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	TGTCAGTACTGCAGATTCCAGAAATGCTTGCAGTTGGAATGTCACATAATGCTATCCGG	540
H.sapiens	TGTCAGTACTGTCGGTTTCAGAAATGCCTTGCAGTGGGGATGCTCATAATGCCATCAGG	537
	***** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	TTTGGGCGAATGCCACAGGCTGAGAAGGAGAAGCTCTTGGCGGAGATTTCAAGTGATATC	600
H.sapiens	TTTGGGCGGATGCCACAGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTGGCGGAGATCTCCAGTGATATC	597
	***** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	GACCAGCTAAATCCCGAGTCTGCTGACCTGCGGGCCCTTGCCAAGCTCCTGTATGATTCA	660
H.sapiens	GACCAGCTGAATCCAGAGTCCGCTGACCTCCGGGCCCTGGCAAAACATTGTATGACTCA	657
	***** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	TACATAAAGTCCTTCCCGCTAACCAAGCCAAGGCGAGGGCGATCTTGACAGGAAAGGCA	720
H.sapiens	TACATAAAGTCCTTCCCGCTGACCAAGCCAAGGCGAGGGCGATCTTGACAGGAAAGACA	717
	***** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	ACAGACAAATCGCCATTTGTCATTTATGACATGAATTCCTTAAGATGGGAGAAGACCAG	780
H.sapiens	ACAGACAAATCACCATTTCGTTATCTATGACATGAATTCCTTAATGATGGGAGAAGATAAA	777
	***** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	ATCAAGTGCAAACATCTGACCCCATGCAAGAGCAGAATAAAGAGGTTGCCATCCGTATC	840
H.sapiens	ATCAAGTTCAAACACATCACCCCTGCAAGAGCAGAGCAAGAGGTTGCCATCCGCATC	837
	***** * * * * * * * * * * *	
P.sicula	TTCCAGCGCTGCCAGTTCCGTTCCGTCGAGGCTGTTCAAGAGATCACAGAATTTGCCAAA	900
H.sapiens	TTTCAGGGCTGCCAGTTTCGCTCCGTCGAGGCTGTCAGGAGATCACAGAGTATGCCAAA	897
	** * * * * * * * * * * *	

**Figura 25:** Allineamento *pairwise* tra la regione codificante il gene *PPARG* di *H.sapiens* e *P.sicula*, mediante il programma CLUSTAL W –continua nella pag. successiva-

P.sicula	AACATTCCAGGTTTTGTAAATCTAGACCTGAACGACCAAGTAACCTCTCCTGAAATATGGG	960
H.sapiens	AGCATTCTGGTTTTGTAAATCTTGACTTGAACGACCAAGTAACCTCTCCTCAAATATGGA	957
	* * * * *	
P.sicula	GTTTCATGAGATCATCTACACACTCCTTGCCTCCATGATGAATAAAGATGGTGTTCATT	1020
H.sapiens	GTCCACGAGATCATTTACACAATGCTGGCCTCCTTGATGAATAAAGATGGGGTTTCATA	1017
	** ** * * * * * * * * *	
P.sicula	TCCAATGGTCAAGGTTTCATGACTCGGGAGTTCCTGAAGAGCCTCCGGAAACCCTTTTGT	1080
H.sapiens	TCCGAGGGCCAAGGCTTCATGACAAGGGAGTTTCTAAAGAGCCTGCGAAAGCCTTTTGGT	1077
	*** * * * * * * * * * *	
P.sicula	GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAATTGCTGTCAAATTCACGCACTGGAATTAGACGAC	1140
H.sapiens	GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAAGTTTGTGTGAAGTTCAATGCACTGGAATTAGATGAC	1137
	* * * * * * * * * * *	
P.sicula	AGTGACCTGGCAATATTTATAGCTGTGCATCATTCTTAGTGAGATCGCCCTGGATTAATA	1200
H.sapiens	AGCGACTTGGCAATATTTATTGCTGTGCATTATTCTCAGTGGAGACCGCCAGGTTTGCTG	1197
	** * * * * * * * * * *	
P.sicula	AATGTGAAGCCCATTTGAGGATATCCAAGACAATTTGCTGCAAGCTTTAGAACTCCAGTTG	1260
H.sapiens	AATGTGAAGCCCATTTGAAGACATTCAAGACAACCTGCTACAAGCCCTGGAGCTCCAGCTG	1257
	* * * * * * * * * * *	
P.sicula	AAGCTGAATCACCCAGAGTCATCACAGCTGTTTGCAAAATTGCTGCAGAAAATGACAGAC	1320
H.sapiens	AAGCTGAACCACCCTGAGTCCTCACAGCTGTTTGCCAAGCTGCTCCAGAAAATGACAGAC	1317
	* * * * * * * * * * *	
P.sicula	CTCAGACAGATTGTAACAGAACATGTGCAGCTGTTGCAAATTATAGAGAAAACGGATACG	1380
H.sapiens	CTCAGACAGATTGTACGGAACACGTGCAGCTACTGCAGGTGATCAAGAAGACGGAGACA	1377
	* * * * * * * * * * *	
P.sicula	GAT-----	1383
H.sapiens	GACATGAGTCTTCACCCGCTCCTGCAGGAGATCTACAAGGACTTGTAAGTAG	1428
	**	

**Figura 25:** Allineamento *pairwise* tra la regione codificante il gene *PPARG* di *H.sapiens* e *P.sicula*, mediante il programma CLUSTAL W.



```

1 atggttgaca cagaaatgcc gttttggccc atgaactttg gaattagccc agtggacttc
61 tctgggatgg atgaacactc acattctttt gatataaagc ctttctactc agttgatttt
121 tcaagccttt cttcacaaca ttatgaggac cttcctcctc tcacaagaac tgaccagatg
181 gctgttgact ataaatacga cttgaagttt caagaatgcc aaaaatgaaat caagatggag
241 cctccttctc caccatacta ctcagaaaaa gtgcagatgt acaataaacc tcatgaagag
301 acctccaatt ctctaattgc tattgaatgc agggtttgtg gagacaaagc gtctggattc
361 cattacggag tgcattgcat tgaaggctgc aagggtttct ttcgcagaac aatccggcta
421 aagttaattc atgatcggg tgatctcaac tgcgcattc ataagaaaag cagaaataaa
481 tgtcagtact gcagattcca gaaatgtctt gcagttggaa tgtcacataa tgctatccgg
541 tttgggcgaa tgcacaggc tgagaaggag aagctcttgg cggagatttc aagtgatatt
601 gaccagctaa atcccagatc tgcagactgc cgggcccttg ccaagctcct gtatgattca
661 tacataaagt cttccccgct aaccaaagcc aaggcgaggg cgatcttgac aggaaggcca
721 acagacaaat cgccatttgt catttatgac atgaattcct taaagatggg agaagaccga
781 atcaagtgc aacatctgac ccccatgcaa gagcagaata aagaggttgc catccgtatc
841 ttccagcgt gccagttccg ttccgtcgag gctgttcaag agatcacaga atttgccaaa
901 aacattccag gttttgtaaa tctagactgc aacgaccaag taactctcct gaaatatggg
961 gtccatgaga tcatctacac actccttgcc tccatgatga ataaagatgg tgttctcatt
1021 tccaatggc aaggtttcat gactcgggag ttctgaaga gcctccggaa acccttttgt
1081 gactttatgg agcccaagtt tgaattcgt gtcaaattca acgcactgga attagacgac
1141 agtgacctgg caatatttat agctgtctac attcttagtg gagatcgccc tggattaata
1201 aatgtgaagc ccattgagga tatccaagac aatttgctgc aagctttaga actccagttg
1261 aagctgaatc acccagagtc atcacagctg tttgcaaaat tgctgcagaa aatgacagac
1321 ctgcagaca ttgtaacaga acatgtgcag ctgttgcaaa ttatagagaa aacggatagc
1381 gat

```

**Figura 26:** Sequenza nucleotidica del gene *PPARG* (1383 bp; Provisional Accession No.1481500) di *Podarcis sicula*, identificata *ex novo* in questo lavoro di tesi di Dottorato.

## *Gallus gallus* estrogen receptor 2 (ER beta) (ESR2), CDS

```

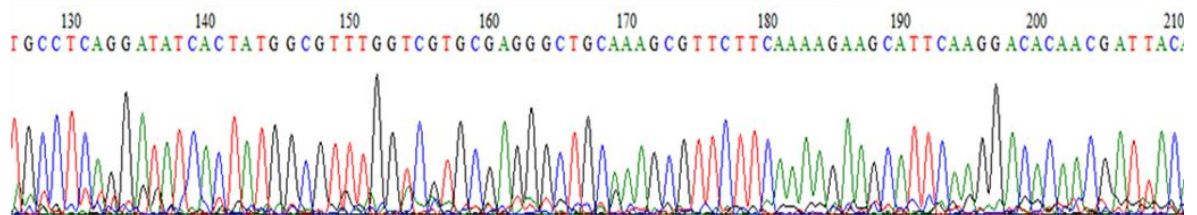
ATGGCA TTCTGCAGTC CTGCTATGCT GAATTACAAC
421 ATAGCCAGCA ATTTTGGTGA TTCTGAGAGT GCATCTGTGA GGCAACATC GAGCCCAAGC
481 GTGTTATGGT CTGCTCCTGG CCACCTCTCT CCTCTGACAC TGCAGTGTCA GTCATCACTT
541 CTGTATGCAG AGCAGCCTAA GAGCCCCTGG TGCGAAGTGA GACCACTGGA CCCAGTGCTG
601 CCTGTCACCA GAGAGACATT AAAAAGAAAA ACTAACGGCA GTGACTGTAC AAGCCCAATT
661 GCAAGTAATC CTGGCTCAAA AAGAGATGCC CACTTCTGCG CAGTCTGCAG TGACTATGCT
721 TCAGGATATC ACTATGGAGT CTGGTCATGT GAAGGCTGCA AAGCATTCTT TAAAAGAAGT
781 ATTCAAGGAC ATAATGATTA CATCTGCCCA GCTACCAATC AATGCACGAT AGACAAAAAC
841 AGGCGCAAAA GCTGCCAGGC ATGCCGGCTA CGGAAATGCT ATGAAGTGGG AATGATGAAA
901 TGTGGCTCAA GAAGAGAACG CTGTGGGTAT CGAATCCTGC GCCGCCATCG TAATTCAGAA
961 GATTGCATGG GCAAAACCAA GAAGTATAAT GAGGCTGCAA CCCGTGTAAA AGAGATCCTC
1021 CTCAGCACAG TCAGTCCAGA ACAGTTTGT TTAACCTCTAC TTGAAGCTGA GCCTCCCAAT
1081 GTGTTGGTGA GTCGTCCTAG CAAACCATTC ACCGAGGCCCT CCATGATGAT GTCCCTGACA
1141 AAAGTGGCAG ACAAAGAGCT GGTTCACATG ATTGGCTGGG CCAAAAAAAT TCCTGGCTTT
1201 ATTGATCTCA GCCTCTATGA CCAAGTCAGG CTCTTGAAA GCTGCTGGAT GGAAGTCTTA
1261 ATGATTGGTT TAATGTGGAG ATCGATCGAC CATCCTGGGA AATTAATTTT CGCACCAGAC
1321 CTGTACTCG ACAGGGACGA GGGGAAATGC GTAGAGGGAA TTTTGAAAAT CTTTGATATG
1381 CTCCTGGCCA TGACCTCGAG GTTCCGAGAG CTGAAACTGC AGCAACAAGG GTATCTGTGT
1441 GTCAAGGCAA TGATCCTCCT CAATTCCAGC ATGTTTCCCT TGTACCAGA AGAAGCCGAA
1501 AGCAACAGGA AACTGCACCA CCTGCTCAAT GTGGTCACAG ATGCTCTGGT GTGGGTATT
1561 GCAAAGAGCG GAATCCCCTC CCAGCAGCAA ACAACTCGCC TGGCCAATCT GTTGATGCTG
1621 CTCTCCCATG TCAGACATGC AAGTAATAAG GGCATGGAGC ATCTGCTGAG CATGAAGTGC
1681 AAAAATGTGG TCCCGGTGTA TGAAGTGTG CTGGAGATGT TGAACGCGCA CACGCTCCGA
1741 GGGCAGAGGA AGTCCCCCGT CACACATCCT GAGTTTGAAC AAGTTTCACA TTTCCAGGTC
1801 TGA

```

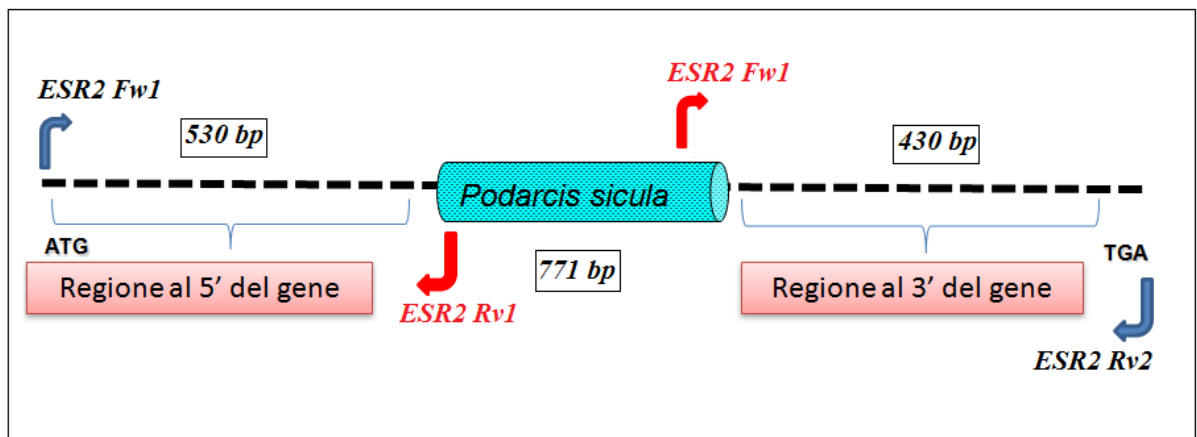
**Figura 27:** Regione codificante del gene *ESR2* di *G.gallus* (NCBI). In giallo è evidenziata la regione codificante i domini DBD ed LBD del gene utilizzata per il disegno di una coppia di oligonucleotidi per l'amplificazione del gene *ESR2* in *P.sicula*.

TCGCATTGCGGGGTGATATCAGAGAGCTGCAGCAAGGGAGGGCTCCGAGCAGGAGAACTTGAG  
GGAGTACACGGAGTCCACGAAAAGGTGGAGGATGACGATTCTGTACCGTGTGCAGCGATTAT  
GCCTCAGGATATCACTATGGCGTTTGGTCGTGCGAGGGCTGCAAAGCGTTCTTCAAAAGAAGCA  
TTCAAGGACACAACGATTACATTGCCCAGCGACAAATCAGTGCACAATAGATAAAAAACAGAC  
GCAAAAGCTGCCAAGCCTGCCGACTTCGGAATGCTATGAAGTCGGGATGATGAAATGTGGTT  
CAAGAAGAGAGCGCTGTGGCTATCGCATAATTCGCCGCCACCGTAACCTCAGACGATCCAGTGC  
ACTGCGCAGGCAAAGTTAAGAAGAACAATGAAGCCATAATTCAAGTAAAGAAGCTGCTGGTCA  
ATGCACTGACCCCGGAACAGTTTCGTTTCCATATTACTTGAAGCCGAGCCTCCAAATGTGTTGGT  
GAGCCGCCCGCAGAAACCGTTTACAGAAGCCTCCATGATGATGTCTCTGACGAAGCTTGCAGAC  
AAAGAACTGGTCCACATGATTGCCTGAGCCAAAAGATTCTGGCTTTATAGAACTCAGTCTGT  
TCGATCAATTTTAGGCTTTTGAAAGCTGTGGCTCGAAGTGTGATGGTGGGTCTGATGTGTAT  
ATCCATCGATACCCCGGCAAGTCATCTTCGCGCCCGGATCTCGGTACTCGAGAGGGACGAAT  
AAAAATTA

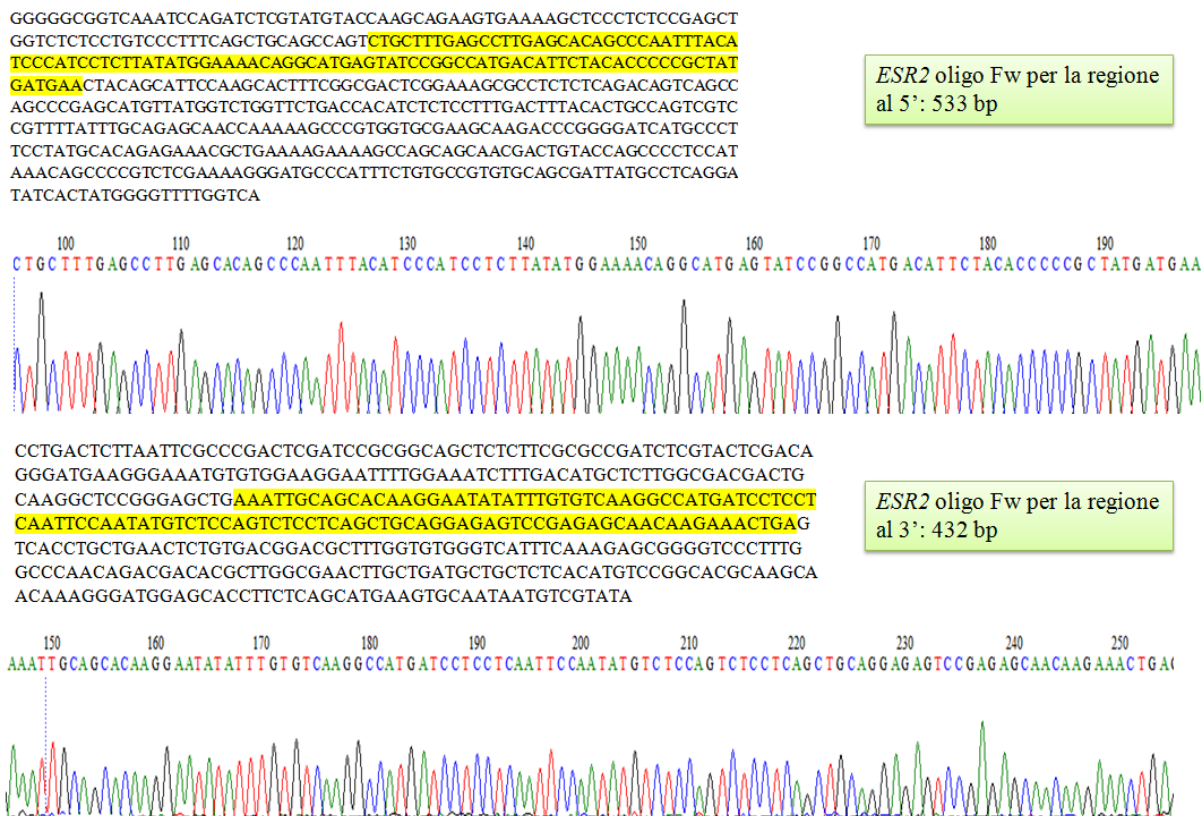
*ESR2* (DBD+LDB)  
oligo Fw: 771 bp



**Figura 28:** Estrapolazione della sequenza ottenuta dalla PCR con l'oligonucleotide forward (Fw) e del relativo elettroferogramma del gene *ESR2* in *Podarcis sicula*. La parte evidenziata in giallo corrisponde al tratto di elettroferogramma riportato in basso.



**Figura 29:** Rappresentazione schematica del gene *ESR2*: la regione centrale in azzurro rappresenta la sequenza nucleotidica del gene identificata in *Podarcis sicula* (domini DBD ed LBD); le frecce indicano gli oligonucleotidi disegnati per l'amplificazione delle regioni al 5' ed al 3' del gene. Le frecce rosse indicano i primers disegnati sul genoma di *Podarcis sicula*.



**Figura 30:** Estrapolazione delle sequenze ottenute dalle PCR con gli oligonucleotidi forward (Fw) e dei relativi elettroferogrammi del gene *ESR2* in *Podarcis sicula*. Le parti evidenziate in giallo corrispondono al tratto di elettroferogramma riportato in basso.

1	atgtccctt	cgtgcatcat	ctcacaagga	gttgccacca	atccaagatc	tcgtatgtac
61	caaagcagaa	gtgaaaagct	ccctctccga	gctggtctct	cctgtccctt	tcagctgcag
121	ccagtctgct	ttgagccttg	agcacagccc	aatttacatc	ccatcctctt	atatggaaaa
181	caggcatgag	tatccggcca	tgacattcta	caccccgct	atgatgaact	acagcatttc
241	aagcactttc	ggcgactcgg	aaagcgcttc	tctcagacag	tcagccagcc	cgagcatgtt
301	atggtctggt	tctgaccaca	tctctccttt	gactttacac	tgccagtcgt	ccgttttatt
361	gtcagagcaa	ccaaaaagcc	cgtggtgcga	agcaagacc	ggggatcatg	cccttcctat
421	gcacagagaa	acgctgaaaa	gaaaaagccag	cagcaacgac	tgtaccagcc	cctccataaa
481	cagccccgtc	tcgaaaaggg	atgccatttt	ctgtgcccgtg	tgacgcgatt	atgcctcagg
541	atatcactat	ggcgtttggt	cgtgcgaggg	ctgcaaaagcg	ttcttcaaaa	gaagcattca
601	aggacacaac	gattacattt	gcccagcgac	aaatcagtg	acaatagata	aaaacagacg
661	caaaagctgc	caagcctgcc	gacttcggaa	atgctacgaa	gtcgggatga	tgaaatgtgg
721	ttcaagaaga	gagcgtctgt	gctatcgcat	aattcgccgc	caccgtaact	cagacgatcc
781	agtgcactgc	gcaggcaaa	ttaagaagaa	caatgaagcc	ataattcaag	taaaaagaact
841	gctggtcaat	gcactgacct	cgaacagtt	cgtttccata	ttacttgaag	ccgagcctcc
901	aaatgtgttg	gtgagccgcc	ccagcaaac	gtttacagaa	gcctccatga	tgatgtctct
961	gacgaagctt	gcagacaaa	aactggtcca	catgattgcc	tgggcaaaaa	agattcctgg
1021	ctttatagaa	ctcagtctgt	tcgatcaagt	aaggcttttg	gaaagctgtt	ggctcgaagt
1081	gttgacggtg	ggtctgatgt	ggagatccat	cgatcacccc	ggcaagctca	tcttcgcgcc
1141	agatctcgta	ctcgacaggg	atgaagggaa	atgtgtggaa	ggaatttttg	aaatctttga
1201	catgctcttg	gcgacgactg	caaggctccg	ggagctgaaa	ttgcagcaca	aggaatatat
1261	ttgtgtcaag	gccatgatcc	tcctcaattc	caatatgtct	ccagtctctc	cagctgcagg
1321	agagtccgag	agcaacaaga	aactgagtca	cctgctgaac	tctgtgacgg	acgctttggt
1381	gtgggtcatt	tcaaagagcg	gggtcccttt	ggcccaacag	acgacacgct	tggcgaactt
1441	gctgatgctg	ctctcacatg	tccggcacgc	aagcaacaaa	gggatggagc	accttctcag
1501	catgaagtgc	aataatgtcg	ta			

**Figura 31:** Sequenza nucleotidica del gene *ESR2* (1522 bp, Provisional Accession No. 1482266) di *Podarcis sicula*, identificata *ex novo* in questo lavoro di tesi di Dottorato.



P. sicula	ATGTCCCCTTCGTGCATCATCTCACAAGGAGTTGCCACCAATCCAAGATCTCGTATGTAC	60
H. sapiens	-----ATG---	3
	***	
P. sicula	CAAAGCAGAAGTGAAGCTCCCTCTCCGAGCTGGTCTCTCCTGTCCCTTTCAGCTGCAG	120
H. sapiens	-----GATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAATTCTCCTTCTCCTACAACCTGCAG	56
	*** * **** * ** * **** * * * * *	
P. sicula	CCAGTCTGCTTTGAGCCTTGAGCACAGCCCAATTTACATCCCATCCTCTTATATGGAAAA	180
H. sapiens	TCAATCCATCTTACCCTGGAGCACGGCTCCATATACATACCTTCTCCTATGTAGACAG	116
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	CAGGCATGAGTATCCGGCCATGACATTCTACACCCCGCTATGATGAACACAGCATTCC	240
H. sapiens	CCACCATGAATATCCAGCCATGACATTCTATAGCCCTGCTGTGATGAATTACAGCATTCC	176
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	AAGCACTTTCGGCGACTCGGAAAGCGCCTCTCTCAGACAGTCAGCCAGCCGAGCATGTT	300
H. sapiens	CAGCAATGTCACTAATTGGAAGGTGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAAATGTGTT	236
	**** * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	ATGGTCTGGTTCTGACCACATCTCTCCTTTGACTTTACACTGCCAGTCGTCGTTTTATT	360
H. sapiens	GTGGCCAACACCTGGGCACCTTTCTCCTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTA	296
	*** * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	TGCAGAGCAACCAAAAGCCCGTGGTGCGAAGCAAGACCCGGGGATCATGCCCTTCCTAT	420
H. sapiens	TGCGGAACCTCAAAGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAGATCGCTAGAACACACCTTACCTGT	356
	*** * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	GCACAGAGAAACGCTGAAAAGAAAGCCAGCAGCAACGACTGTACCAGCCCCTCCATAAA	480
H. sapiens	AAACAGAGAGACACTGAAAAGGAAGTTAGTGGGAACCGTTGCGCCAGCCCT---GTTAC	413
	***** * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	CAGCCCCGTCTCGAAAAGGGATGCCATTCTGTGCCGTGTGCAGCGATTATGCCCTCAGG	540
H. sapiens	TGGTCCAGGTTCAAAGAGGGATGCTCACTTCTGCGCTGTCTGCAGCGATTACGCATCGGG	473
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	ATATCACTATGGCGTTTGGTCGTGCGAGGGCTGCAAAGCGTTCTTCAAAGAAGCATTCA	600
H. sapiens	ATATCACTATGGAGTCTGGTCGTGTGAAGGATGTAAAGCCTTTTTTAAAGAAGCATTCA	533
	***** * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	AGGACACAACGATTACATTTGCCAGCGACAAATCAGTGACAATAGATAAAAACAGACG	660
H. sapiens	AGGACATAATGATTATATTTGTCCAGCTACAAATCAGTGACAATCGATAAAAACCGGCG	593
	***** * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	CAAAGCTGCCAAGCCTGCCGACTTCGGAATGCTACGAAGTCGGGATGATGAATGTGG	720
H. sapiens	CAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGACTTCGGAAGTGTACGAAGTGGAATGGTGAAGTGTGG	653
	*** * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	TTCAAGAAGAGAGCGCTGTGGCTATCGCATAATTCGCCGCCACCGTAACTCAGACGATCC	780
H. sapiens	CTCCCGGAGAGAGAGATGTGGGTACCGCCTTGTGCGGAGACAGAGAAGTGCCGACGAGCA	713
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	AGTGCACTGCGCAGGCAAAGTTAAGAAGAACAAATGAAGCCATAATTCAAGTAAAAGAACT	840
H. sapiens	GCTGCACTGTGCCGGCAAGGCCAAGAGAAGTGCGGCCACGCGCCCCGAGTGCGGGAGCT	773
	***** * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	GCTGGTCAATGCACTGACCCCGAACAGTTCGTTTCCATATTACTTGAAGCCGAGCCTCC	900
H. sapiens	GCTGCTGGACGCCCTGAGCCCGAGCAGCTAGTGCTACCCCTCCTGGAGGCTGAGCCGCC	833
	*** * * * * * * * * * * * * * * *	
P. sicula	AAATGTGTTGGTGAGCCGCCAGCAAACCGTTTACAGAAGCCTCCATGATGATGTCTCT	960
H. sapiens	CCATGTGCTGATCAGCCGCCAGTGCGCCCTTACCGAGGCCTCCATGATGATGTCCCT	893
	***** * * * * * * * * * * * * * *	

**Figura 32:** Allineamento *pairwise* tra la regione codificante il gene *ESR2* di *H.sapiens* e *P.sicula*, mediante il programma CLUSTAL W –continua nella pag. successiva-

P.sicula	GACGAAGCTTGCGAGACAAAGAACTGGTCCACATGATTGCCTGGGCCAAAAAGATTCTCTGG	1020
H.sapiens	GACCAAGTTGGCCGACAAGGAGTTGGTACACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATTCCC	953
	*** ** * * * ***** *	
P.sicula	CTTTATAGAACTCAGTCTGTTTCGATCAAGTAAGGCTTTTGGAAAGCTGTTGGCTCGAAGT	1080
H.sapiens	CTTTGTGGAGCTCAGCCTGTTTCGACCAAGTGC	1013
	***** * * * * ***** *	
P.sicula	GTTGACGGTGGGTCTGATGTGGAGATCCATCGATCACCCCGGCAAGCTCATCTTCGCGCC	1140
H.sapiens	GTTAATGATGGGGCTGATGTGGCGCTCAATTGACCACCCCGGCAAGCTCATCTTTGCTCC	1073
	*** * * * * ***** *	
P.sicula	AGATCTCGTACTCGACAGGGATGAAGGGAAATGTGTGGAAGGAATTTTGGAAATCTTTGA	1200
H.sapiens	AGATCTTGTCTGGACAGGGATGAGGGGAAATGCGTAGAAGGAATTCTGGAAATCTTTGA	1133
	***** * * * * ***** *	
P.sicula	CATGCTCTTGGCGACGACTGCAAGGCTCCGGGAGCTGAAATTGCAGCACAAGGAATATAT	1260
H.sapiens	CATGCTCCTGGCAACTACTTCAAGGTTTCGAGAGTTAAAACTCCAACACAAAGAAATATCT	1193
	***** * * * * ***** *	
P.sicula	TTGTGTCAAGGCCATGATCCTCCTCAATTCCAATATGT --CTCCAGTCTCCTCAGCTGC	1317
H.sapiens	CTGTGTCAAGGCCATGATCCTGCTCAATTCCAGTATGTACCCTCTGGTCACAGCGACC-C	1252
	***** * * * * ***** *	
P.sicula	AGGAGAGTCCGAGAGCAACAAGAACTGAGTCACCTGCTGAACTCTGTGACGGACGCTTT	1377
H.sapiens	AGGATG -CTGACAGCAGCCGGAAGCTGGCTCACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTT	1310
	*** * * * * ***** *	
P.sicula	GGTGTGGGTCATTTCAAAGAGCGGGGTCCTTTTGGCCCAACAGACGACACGCTTGGCGAA	1437
H.sapiens	GGTTTGGGTGATTGCCAAGAGCGGCATCTCCTCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAA	1370
	*** ***** * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *	
P.sicula	CTTGCTGATGCTGCTCTCACATGTCCGGCACGCAAGCAACAAAGGGATGGAGCACCTTCT	1497
H.sapiens	CCTCCTGATGCTCCTGTCCCACGTCAGGCATGCGAGTAACAAGGGCATGGAACATCTGCT	1430
	* * ***** *	
P.sicula	CAGCATGAAGTGCAATAATGT-----CGTA-----	1522
H.sapiens	CAACATGAAGTGCAAAAATGTGGTCCCAGTGTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGAATGC	1490
	** ***** *	
P.sicula	-----	
H.sapiens	CCACGTGCTTCGCGGGTGCAAGTCTCCATCACGGGGTCCGAGTGCAGCCCGGCAGAGGA	1550
P.sicula	-----	
H.sapiens	CAGTAAAAGCAAAGAGGGCTCCAGAACCCACAGTCTCAGTGA	1593

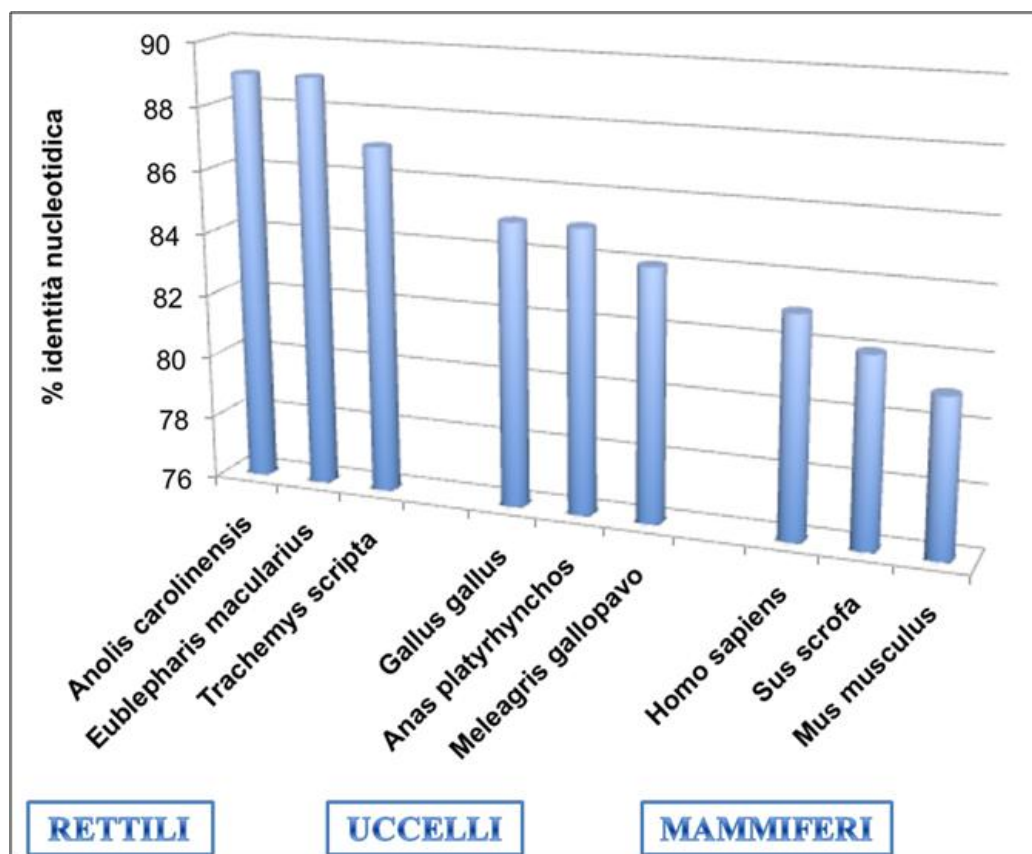
**Figura 32:** Allineamento *pairwise* tra la regione codificante il gene *ESR2* di *H.sapiens* e *P.sicula*, mediante il programma CLUSTAL W.

<i>PPARG</i>	SPECIE	Identità (nt)	Lunghezza (nt)	ID accesso gene (NCBI)	Identità (aa)	Num. aa	Prot. ID (NCBI)
Vertebrati	<i>Anolis carolinensis</i>	89%	1673	XM003217673.1	95%	475	XP003217721.1
	<i>Eublepharis macularius</i>	89%	1747	AB360446.1	94%	476	BAF79869.1
	<i>Anser anser</i>	85%	1417	AF481798.1	93%	472	AAL87700.1
	<i>Anas platyrhynchos</i>	85%	1650	EF546801.2	93%	475	ABQ23994.2
	<i>Gallus gallus</i>	85%	2089	NM_001001460.1	93%	475	NP001001460.1
	<i>Meleagris gallopavo</i>	84%	2086	XM003210040.1	93%	475	XP003210088.1
	<i>Nomascus leucogenys</i>	83%	2018	XM003264988.1	91%	477	XP003265036.1
	<i>Pan troglodytes</i>	83%	1856	XM001153669.2	91%	505	XP001153669.1
	<i>Homo sapiens</i>	83%	1892	NM_138712.3	90%	477	NP005028.4
	<i>Trachemys scripta</i>	87%	1179	AJ243133.1	96%	393	CAB61263.1
	<i>Pongo abelii</i>	83%	1828	NM_001131183.1	91%	477	NP001124655.1
	<i>Macaca mulatta</i>	83%	1759	NM_001032860.1	91%	505	NP001028032.1
	<i>Loxodonta africana</i>	83%	1522	XM_003409970.1	89%	486	XP003410018.1
	<i>Equus caballus</i>	82%	1844	XM_001492411.2	90%	474	XP001492480.1
	<i>Callithrix jacchus</i>	82%	1843	XM_002758639.1	91%	505	XP002758685
	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	82%	1820	XM_002921267.1	90%	529	XP002921313.1
	<i>Crocodylus niloticus</i>	86%	1179	AJ243132.1	96%	393	CAB61238.1
	<i>Cricetulus griseus</i>	82%	1709	NM_001244281.1	90%	475	NP001231210.1
	<i>Sus scrofa</i>	82%	1758	NM_214379.1	90%	504	NP999544.1
	<i>Rattus norvegicus</i>	81%	1805	NM_013124.3	90%	505	NP037256.1
	<i>Bos taurus</i>	82%	1815	NM_181024.2	90%	505	NP851367.1
	<i>Taeniopygia guttata</i>	81%	1428	XM_002187910.1	92%	475	XP002187946.1
	<i>Mus musculus</i>	81%	1857	NM_001127330.1	90%	475	NP001120802.1
	<i>Canis lupus</i>	81%	1830	NM_001024632.2	90%	505	NP001019803.1

**Tabella 4:** Percentuali di identità nucleotidiche ed amminoacidiche per il gene *PPARG* identificato in *P.sicula*.







**Figura 34:** Conservazione della regione codificante (CDS) del gene *PPARG* di *Podarcis sicula* in tre classi di vertebrati.

A.platyrrhynchos	ATGGTTGACACAGAAATGCCGTTTTGGCCCATTAATTTTGAATTAGCCCAGTGGATCTG	60
G.gallus	ATGGTTGACACAGAAATGCCGTTTTGGCCCGTTAATTTTGAATTAGCCCAGTGGATCTG	60
P.sicula	ATGGTTGACACAGAAATGCCGTTTTGGCCCATGAACTTTGAATTAGCCCAGTGGACTTC	60
A.carolinensis	ATGGTTGATACAGAAATGCCGTTTTGGCCCATGAACTTTGAATTAGCCCTGTCGACCTC	60
E.macularius	ATGGTTGACACAGAAATGCCGTTTTGGTCCGTAACTTTGAATTAGCCCAGTGGACCTT	60
H.sapiens	ATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCACCAACTTTGGGATCAGCTCCGTTGGATCTC	60
M.musculus	ATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCACCAACTTCGGAATCAGCTCTGTGGACCTC	60
	*****	
A.platyrrhynchos	TCTGCGATGGATGATCATACACATTCTTTGACATAAAACCATTACCCTGTTGATTTT	120
G.gallus	TCTGCGATGGATGATCATATGCATTCTTTGACATAAAGCCATTACCCTGTTGATTTT	120
P.sicula	TCTGGGATGGATGAACACTCACATTCTTTGATATAAAGCCTTTCACATACAGTTGATTTT	120
A.carolinensis	TCTGCAATGGATGAACATTACATTCTTCGACATAAAGCCCTTTACTACAGTTGATTTT	120
E.macularius	TCTGCAATGGACGATCACTCCCATTCTTTGACATAAAGCCTTTACCACAGTTGATTTT	120
H.sapiens	TCCGTAATGGAAGACCACTCCCCTCTTTGATATCAAGCCCTTCACTACTGTTGACTTC	120
M.musculus	TCCGTGATGGAAGACCACTCGCATTCTTTGACATCAAGCCCTTTACCACAGTTGATTTT	120
	** * ***** ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
A.platyrrhynchos	TCAAGCACTTCTTACCACACTATGAAGATATTCC---TCTTGCAAGAAGCTGATCAGACA	177
G.gallus	TCAAGCATTTCTTACCACACTATGAAGATATACC---TCTTGAAGAGCTGATCAAACA	177
P.sicula	TCAAGCCTTTCTTCAACATTATGAGGACCTTCCCTCTCACAAGAAGCTGACCAAGATG	180
A.carolinensis	TCAAGCCTTTCTTACCACATTATGAAGACCTTGC---TCTGGAAGAAGCTGACCAAGATG	177
E.macularius	ACCAGTCTTTCTTACCACATTATGAAGATCTTCC---TCTCACAAGAAGCTGACCAAGATG	177
H.sapiens	TCCAGCATTTCTACTCCACATTACGAAGACATTCC---ATTCAAGAAGCTGACCAAGATG	177
M.musculus	TCCAGCATTTCTGCTCCACACTATGAAGACATTCC---ATTCAAGAAGCTGACCAAGATG	177
	* *	
A.platyrrhynchos	AGCATTGATTATAAATATGATATCAAGCTCCAGGATTGCCAAAGTGCAATCAAAATGGAG	237
G.gallus	AGCATTGATTATAAATATGATATCAAGCTCCAGGATTGCCAAAGTGCAATCAAAATGGAG	237
P.sicula	GCTGTTGACTATAAATACGACTTGAAGTTTCAAGAATGCCAAAGTGAATCAAGATGGAG	240
A.carolinensis	GCCATTGACTACAAATATGATGTGAAATTTCAAGAGTGCCAAACACTATCAAGCTAGAG	237
E.macularius	GCAATTGATTACAAATATGATATGAAACTTCAAGAGTGCCAAAGTGTAATCAAGATGGAG	237
H.sapiens	GTTGCAGATTACAAGTATGACCTGAAACTTCAAGAGTACCAAGTGCAATCAAAATGGAG	237
M.musculus	GTTGCTGATTACAAATATGACCTGAAGCTCCAAGAATACCAAGTGCGATCAAAATAGAA	237
	* *	
A.platyrrhynchos	CCTCCTTCCCCACCCTATTTTTCTAGAAAAAGTTTCAGTTGTACAATAAACCTCATGAGGAG	297
G.gallus	CCTCCTTCTCCTCCTATTTTTCTGAAAAAGTGCAAGTTATACAATAAACCTCACGAGGAG	297
P.sicula	CCTCCTTCTCCACCACTACTCAGAAAAAGTGCAAGTGTACAATAAACCTCATGAAGAG	300
A.carolinensis	CCTCCATCTCCGCCATACTTCTCAGAAAAAGTTTCAATGTACAATAAATCTCATGAAGAC	297
E.macularius	CCCCCTCTCCACCCTACTTCTCAGAAAAAGTTTCAGCTGTACAATAAAGCTCATGAAGAA	297
H.sapiens	CCTGCATCTCCACCTTATTATTCTGAGAAAGACTCAGCTCTACAATAAGCCTCATGAAGAG	297
M.musculus	CCTGCATCTCCACCTTATTATTCTGAAAAAGACCCAGCTCTACAACAGGCCTCATGAAGAA	297
	* *	
A.platyrrhynchos	TCTTCCAACCTCCCTTATGGCTATTGAATGTCGTGTGTGTGGGGACAAGGCCTCTGGATTT	357
G.gallus	TCTTCCAACCTCACTTATGGCTATTGAATGTCGTGTGTGTGGGGACAAGGCCTCTGGATTT	357
P.sicula	ACCTCCAATTCTCTAATGGCTATTGAATGCAGGGTTTGTGGAGACAAAGCGCTCGGATTC	360
A.carolinensis	ACCTCCAGTTCTCTAATGGCTATTGAATGCAGAGTGTGTGGGGACAAGGCTTCTGGATTT	357
E.macularius	GCTTCCAGTTCTCTAATGGCTATTGAATGCAGGGTGTGCGGAGACAAAGCTTCTGGGTTT	357
H.sapiens	CCTTCCAACCTCCCTCATGGCAATTGAATGTCGTGTGTGTGGAGATAAAGCTTCTGGATTT	357
M.musculus	CCTTCTAACTCCCTCATGGCATTGAGTGCCGAGTCTGTGGGGATAAAGCATCAGGCTTC	357
	* *	
A.platyrrhynchos	CATTATGGTGTGCATGCATGTGAAGGTTGTAAGGGCTTTTTTTCGAAGAACCATCAGATTA	417
G.gallus	CATTATGGAGTGCATGCATGTGAAGGTTGTAAGGGCTTTTTTTCGAAGAACAATCAGATTA	417
P.sicula	CATTACGGAGTGCATGCATGTGAAGGCTGCAAGGGTTTCTTTCGAGAACAAATCCGGCTA	420
A.carolinensis	CATTATGGAGTTCACGCATGTGAAGGCTGCAAGGGCTTCTTTCGTAGAACAAATCCGGTTA	417
E.macularius	CATTACGGAGTGCATGCATGTGAAGGCTGTAAGGGTTTCTTTCGAAGAACAATCCGGTTA	417
H.sapiens	CACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTTTCTTTCGGAAGAACAATCAGATTG	417
M.musculus	CACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTTTTTTTCCGAAGAACCATCCGATTG	417
	* *	

**Figura 35:** Allineamento multiplo tra le regioni codificanti il gene *PPARG* mediante il programma CLUSTAL W –continua nella pag. successiva-







```

A.platyrrhynchos AACATTCCAGGCTTTGTGAATCTTGACCTGAATGATCAAGTAACGCTCCTGAAATACGGT 957
G.gallus AACATTCCAGGTTTTGTGAATCTTGACCTGAATGATCAGGTAACCCCTCCTGAAATATGGT 957
P.sicula AACATTCCAGGTTTTGTAAATCTAGACCTGAACGACCAAGTAACCTCCTCGAAATATGGG 960
A.carolinensis AGCATTCCAGGCTTTGTGAGTTTGGACCTGAATGACCAAGTAACCCCTCCTGAAATACGGT 957
E.macularius AGCATTCCAGGCTTTGTGAGCTAGACCTGAATGACCAAGTAACCTCCTGAAATATGGT 957
H.sapiens AGCATTCTGGTTTTGTAAATCTTGACTTGAACGACCAAGTAACCTCCTCGAAATATGGA 957
M.musculus AATATCCCTGGTTTTCATTAACTTGATTTGAATGACCAAGTGACTCTGCTCAAGTATGGT 957
* * * * *

A.platyrrhynchos GTCCATGAGATCATATATACTCTCCTGGCTTCTCTGATGAATAAAGATGGAGTCTTATA 1017
G.gallus GTCCATGAGATCATATATACTCTCCTGGCTTCTCTGATGAATAAAGATGGAGTCTTATA 1017
P.sicula GTTCATGAGATCATCTACACACTCCTTGCCCTCATGATGAATAAAGATGGTGTCTCATT 1020
A.carolinensis GTCCATGAGATCATCTACACACTCCTTGCCCTCATGATGAATAAAGACGGTGTCTCATA 1017
E.macularius GTCCACGAAATCATCTATACGCTGCTGGCCTCATGATGAATAAAGACGGTGTCTCATT 1017
H.sapiens GTCCACGAGATCATTTACACAATGCTGGCCTCCTTGATGAATAAAGATGGGTTCTCATA 1017
M.musculus GTCCATGAGATCATCTACACGATGCTGGCCTCCTGATGAATAAAGATGGAGTCTCATC 1017
* * * * *

A.platyrrhynchos TCTGATGGACAAGGTTTCATGACACGGGAGTTTCTGAAGAGCCTGAGAAAACCTTTTTGT 1077
G.gallus TCTGATGGACAAGGATTCATGACACGGGAGTTTCTGAAGAGTCTGAGAAAACCTTTTTGT 1077
P.sicula TCCAATGGTCAAGGTTTCATGACTCGGGAGTTCTGAAGAGCCTCGGAAAACCTTTTTGT 1080
A.carolinensis TCTGATGGACAAGGATTCATGACTCGGGAGTTCTCAAGAGCCTCGGAAAACCTTTTTGT 1077
E.macularius TCAATGGACAAGGATTCATGACTCGGGAGTTTTTAAAGAGTCTGCGAAAACCTTTTTGT 1077
H.sapiens TCCGAGGGCCAAAGGCTTCATGACAAGGAGTTTCTAAAGAGCCTGCGAAAACCTTTTTGT 1077
M.musculus TCAGAGGGCCAAAGGATTCATGACGAGGAGTTCTCAAAAGCCTCGGAAAACCTTTTTGT 1077
* * * * *

A.platyrrhynchos GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAGTTGCTGTGAAAGTTCAATGCACTGGAATTAGATGAC 1137
G.gallus GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAGTTTGCTGTGAAAGTTCAACGCACTGGAATTAGATGAC 1137
P.sicula GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAAATTCGCTGTCAAATTCACGCACTGGAATTAGACGAC 1140
A.carolinensis GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAGTTTGCTGTGAAAGTTCAATGCACTGGAATTAGACGAC 1137
E.macularius GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAGTTTGCTGTCAAATTCACGCACTGGAATTAGATGAC 1137
H.sapiens GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAGTTTGCTGTGAAAGTTCAATGCACTGGAATTAGATGAC 1137
M.musculus GACTTTATGGAGCCCAAGTTTGAGTTTGCTGTGAAAGTTCAATGCACTGGAATTAGATGAC 1137
* * * * *

A.platyrrhynchos AGTGACCTAGCAATATTTATAGCCGTCATTATACTAAGCGGAGACCGCCAGGTTTGTTA 1197
G.gallus AGTGACCTGGCAATATTTATAGCTGTCTATTATACTAAGTGAGATCGCCAGGTTTGTTA 1197
P.sicula AGTGACCTGGCAATATTTATAGCTGTCTATTCTTAGTGAGATCGCCCTGGATTAA 1200
A.carolinensis AGTGATCTGGCAATATTTATAGCTGTCTATTCTCAGTGAGATCGCCCTGGATTACT 1197
E.macularius AGCGATTTGGCAATATTTATAGCCGTCATTATACTCAGTGAGATCGCCCTGGATTACT 1197
H.sapiens AGCGACTTGGCAATATTTATTGCTGTCTATTCTCAGTGAGACCGCCAGGTTTGCTG 1197
M.musculus AGTGACTTGGCTATATTTATAGCTGTCTATTCTCAGTGAGACCGCCAGGTTTGCTG 1197
* * * * *

A.platyrrhynchos AATGTGAAGCCCATTTGAAGATATACAAGACAATCTGCTGCAAGCTTTGGAGCTCCAGCTG 1257
G.gallus AATGTGAAGCCCATTTGAAGATATACAAGATAATCTGTTGCAAGCTTTGGAGCTCCAGCTA 1257
P.sicula AATGTGAAGCCCATTTGAGGATATCCAAGACAATTTGCTGCAAGCTTTAGAACTCCAGTTG 1260
A.carolinensis AATGTGAAGCCCATTTGAAGATATTTCAAGACAATTTGCTGCAAGCTTTGGAATCCAGTTA 1257
E.macularius AATGTGAAGCCCATTTGAAGACATACAAGACAATTTGCTGCAAGCTTTAGAACTCCAGTTA 1257
H.sapiens AATGTGAAGCCCATTTGAAGACATTTCAAGACAACCTGCTACAAGCCCTGGAGCTCCAGCTG 1257
M.musculus AACGTGAAGCCCATCGAGGACATCCAAGACAACCTGCTGCAAGCCCTGGAAGCTGCAAGCTC 1257
* * * * *

A.platyrrhynchos AAAGTGAATCATCCAGAGTCGTACAGCTGTTTGCCAAATTGCTCCAGAAAATGACGGAC 1317
G.gallus AAGCTGAATCATCCAGAGTCATCACAGCTGTTTGCAAAATTGCTTCAGAAAATGACGGAC 1317
P.sicula AAGCTGAATCACCCAGAGTCATCACAGCTGTTTGCAAAATTGCTGCAGAAAATGACAGAC 1320
A.carolinensis AAGCTGAATCACCCAGAGTCATCACAGCTGTTTGCAAAATTGTTGCAGAAAATGACAGAT 1317
E.macularius AAAGTGAATCATCCTGAATCCTCACAGCTGTTTGCAAAATTGCTGCAGAAAATGACAGAT 1317
H.sapiens AAGCTGAACACCCCTGAGTCTCACAGCTGTTTGCCAAAGCTGCTCCAGAAAATGACAGAC 1317
M.musculus AAGCTGAATCACCCAGAGTCCTCTCAGCTGTTTGCCCAAGGTGCTCCAGAAAGTACAGAC 1317
* * * * *

A.platyrrhynchos CTCAGACAGATTGTAACGGAACACGTGCAGCTGTTGCAAAATAATAAGAAAACGGAGACA 1377
G.gallus CTCAGACAAATTGTAACGGAACACGTGCAGCTGTTGCAAAATAATAAGAAAACGGAAACA 1377
P.sicula CTCAGACAGATTGTAACAGAACATGTCAGCTGTTTGCAAAATTATAGAGAAAACGGATACG 1380
A.carolinensis CTCAGACAGATTGTCACAGAGCATGTCAGCTGTTGCAAGATTATAAGAAAACGGAGACA 1377
E.macularius CTCAGACAGATTGTAACGGAACACGTGCAGCTGTTGCAAAATCATAAGAAAACGGAGACA 1377
H.sapiens CTCAGACAGATTGTCACGGAACACGTGCAGCTGTTGCAAGGTGATCAAGAAAGACGGAGACA 1377
M.musculus CTCAGGACAGATGTCACAGAGACGTGCAGCTACTGCATGTGATCAAGAAAGACAGAGACA 1377
* * * * *

A.platyrrhynchos GATATGAGTCTTCATCCACTCCTAC--AAGAAATCTATAAAGACTTGATTAA 1428
G.gallus GATATGAGTCTTCATCCACTCCTAC--AAGAAATCTATAAAGACTTATATTAA 1428
P.sicula GAT----- 1383
A.carolinensis GATATGAGCCTTCACCCACTCCTAC--AAGAAATTTATAAGGACTTGATTAA 1428
E.macularius GATATGAGTCTTCATCCACTCCTAACAAAGAAAATTTACAAGGACTTGATTAA 1431
H.sapiens GACATGAGTCTTCACCCGCTCCTGC--AGGAGATCTACAAGGACTTGACTAG 1428
M.musculus GACATGAGCCTTCACCCCTGCTCC--AGGAGATCTACAAGGACTTGATTAG 1428
* *

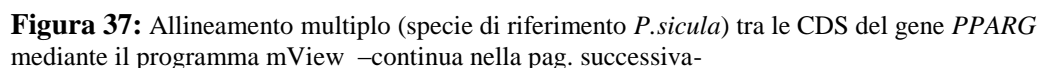
```

**Figura 35:** Allineamento multiplo tra le regioni codificanti il gene *PPARG* mediante il programma CLUSTAL W.

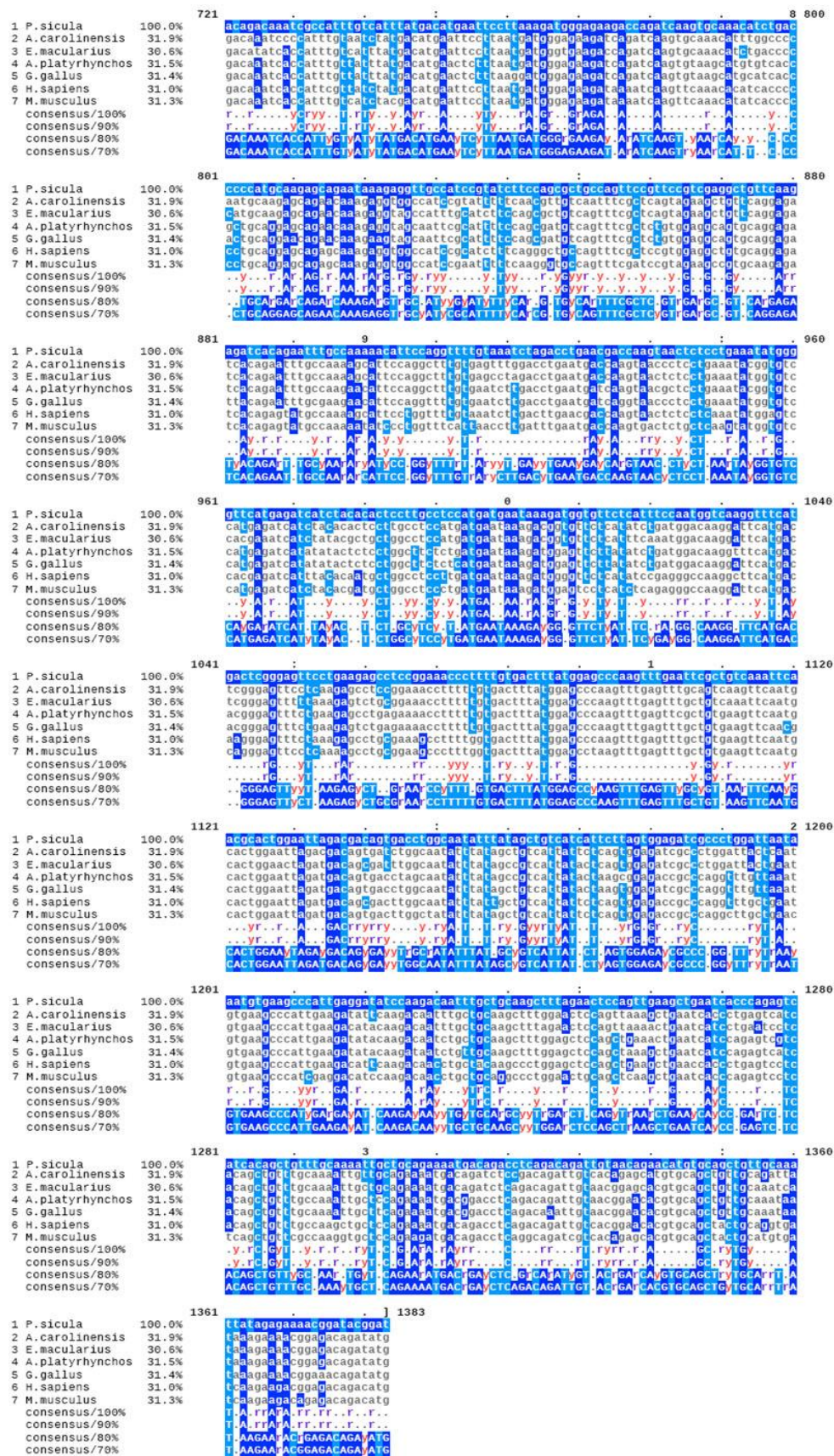






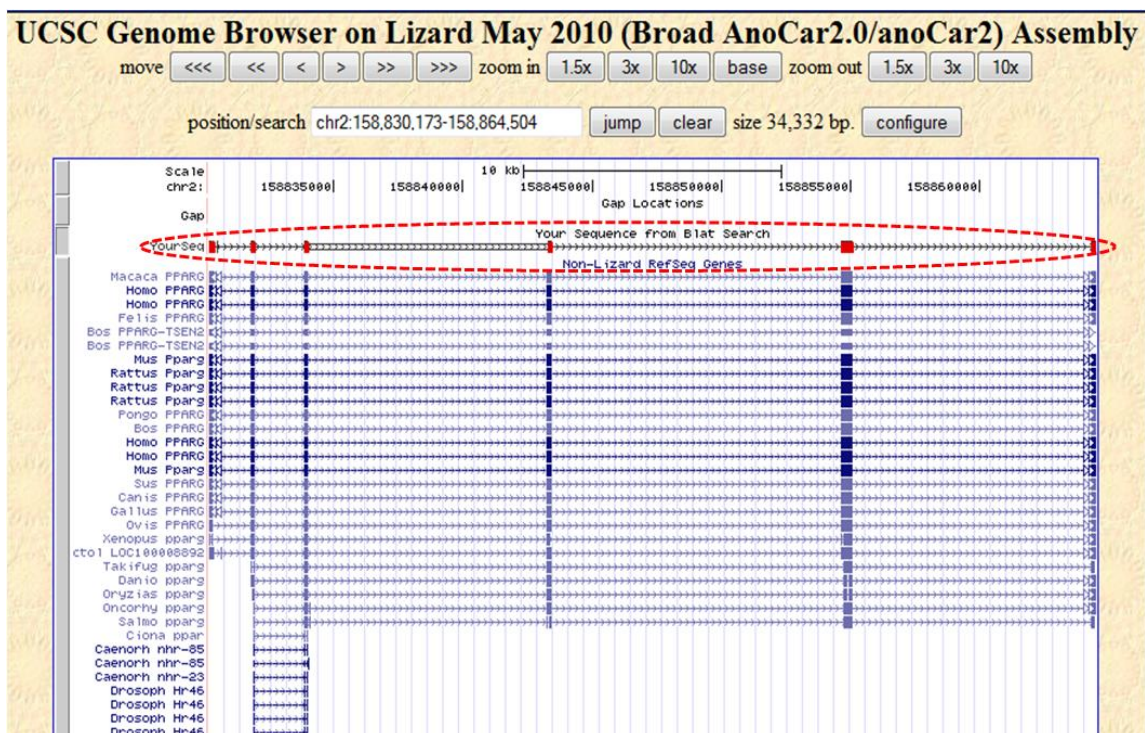






**Figura 37:** Allineamento multiplo (specie di riferimento *P. sicula*) tra le CDS del gene *PPARG* mediante il programma mView.





### Alignment of Podarcis

[Podarcis](#)  
[Lizard chr2](#)  
[block1](#)  
[block2](#)  
[block3](#)  
[block4](#)  
[block5](#)  
[block6](#)  
[block7](#)  
[together](#)

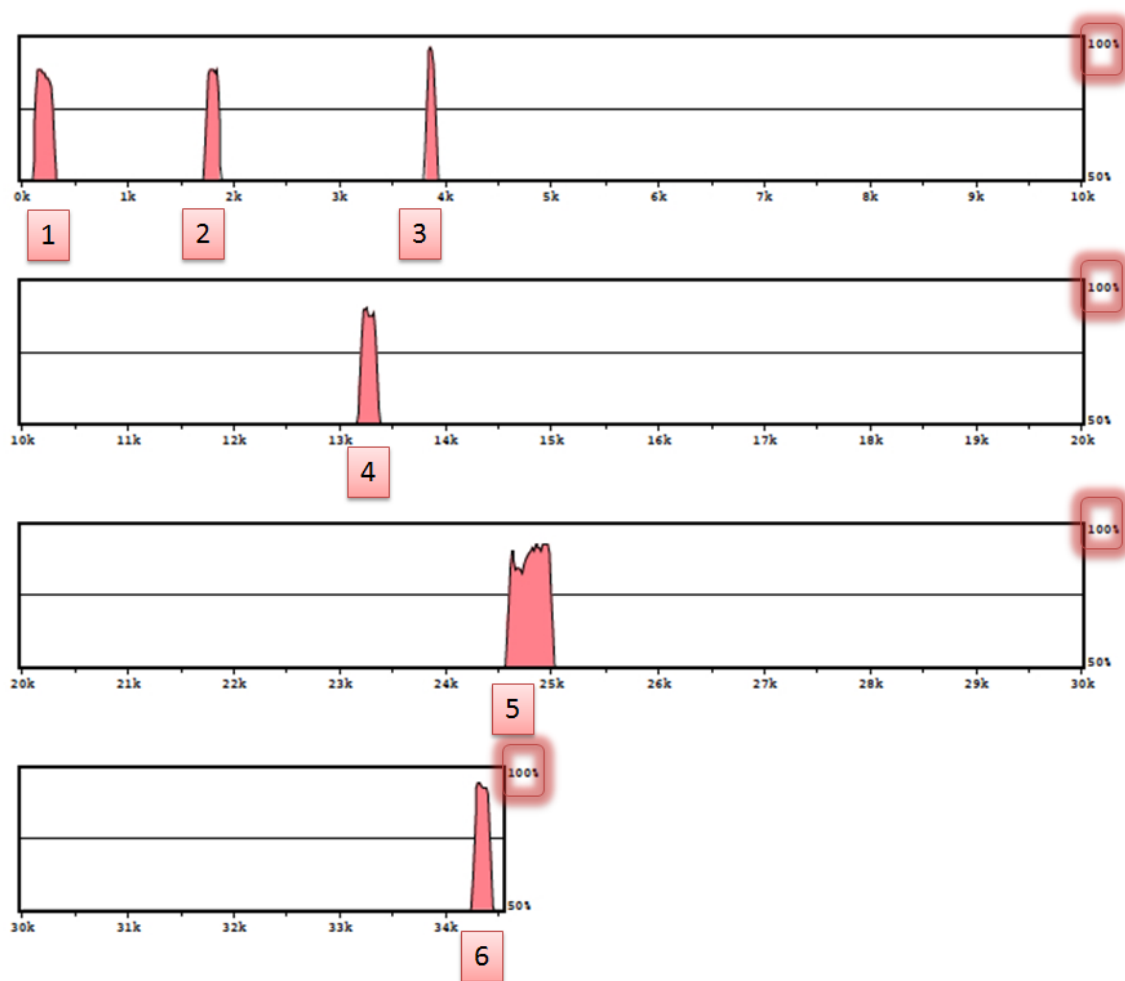
### cDNA Podarcis

```

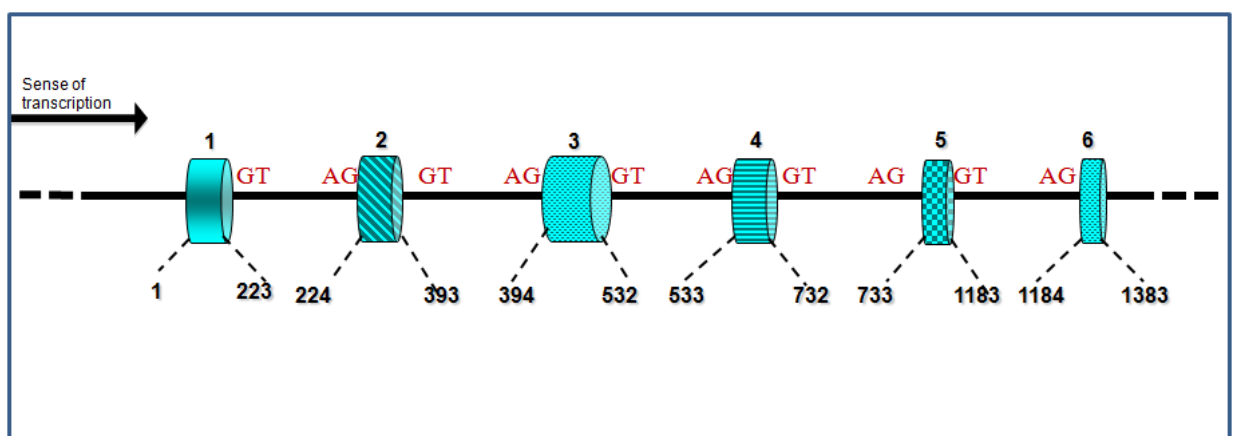
ATGTTGACa CAGAAATGCC GTTTGGCCC ATGAACITTT GAATTAGCCC 50
aGtGACtTC TCTGggATGG ATGAACaTC ACATTCtTTt GAtATAAGC 100
CTTtCACTAC AGTTGATTTT TCAAGCCTTT CTTCAcaACA TTATGAgGAC 150
CTTcctcctc tcaCAAGAAC TGACCAGATG GctgTTGACT AtAAATAcGA 200
ctTGAAgTTT CAAGAaTGCC AAAATGAaAT CAAGaTgGAG CCTCCtTCTC 250
CaCCATACTa CTCAGAAAAA GTgCAgATGT ACAATAAAcC TCATGAAGAa 300
ACCTCCAaTT CTCTAATGGC tATTGAATGC AGgGTtTGTG GaGACAAAGC 350
gTCTGGATTc CAITAcGGAG TgCatGCATG TGAAGGCTGC AAGGGtTTCT 400
TTCGcAGAAC AATCCGGcTA AAGTTAATCT ATGATCGgTG TGAtCTCAAC 450
TGTCGCATTc ATAAGAAAAG CAGAAATAAA TGTCAGTACT GCAGATTCCA 500
GAAATGcCTT GCAGTtGGAA TGTCACaAA Tgctatccgg tttgggcgaA 550
TGCCACAgGC TGAGAAGGAG AAGCTCTTGG CgGAGATTTC AAGTGAaATC 600
GACCAGCTAA AtCCCAGATC tGCTGAcCTG CGggCCCTtG CCAAGCTCtT 650
GTATGATTCA TACATaAAgT CCTTCCCgCT aACCAAGGCC AAGGCgAGGG 700
CgATCTTGAC AGGAAAGgCA ACAGACAAAT CGCCATTGT cATtTATGAC 750
ATGAATTCTT TAAaGATGGG AGAAGAcCAG ATCAAGTGCA AACATcTGaC 800
CCCcATGCAA GAGCAGAAaA AAGAGGTtGC CATCCGTATc TTcCAgCGtT 850
GcCAgTTcCG tTCcGTcGAg GCTGTTCaAg AGATCACAGA ATTtGCCAAA 900
AaCAATCCAG GtTTTGTaAa TcTaGACCTG AAcGACCAAG TAActCTCCT 950
GAAATAtGGg GTtCATGAGA TCATCTACAC ACTCCTTGCC TCCATGATGA 1000
ATAAAGAtGG TGTTCTCATt TccaATGGtC AAGgtTTCAT GACTCGGGAG 1050
TTCTGtAAGA GCCTCCGGAA ACCcTTTGTG GACTTTATGG AGCCCAAGTT 1100
TGAAttcGct GTCAaATTCA AcGCACTGGA ATTAGACGAC AGTGAcCTGG 1150
CAATATTtAT AGCTGICATc ATTCTtAGTG GAGATCGCCC TGGATTAAaTa 1200
AATGTGAAGC CCATTGAaGA TATcCAAGAC AATTtGCTGC AAGCTTTaGA 1250
ACTCCAGTTg AAGCTGAATC ACCCAgAGTC ATCAGAGCTG TTTGCAAAAT 1300
TGcTGCAGAA AATGACAGAc CTCaGACAGA TTGTaACAGA aCATGTGCAG 1350
CTGTTGCAaA TTATaGAGAA AACGGAtacg gat

```

**Figura 38:** In alto, allineamento tramite BLAT (UCSC, *University of California, Santa Cruz*) dell'mRNA di *Podarcis sicula* vs il DNA genomico del gene *PPARG* in diversi organismi. In rosso è evidenziata la sequenza di *Podarcis sicula* che mostra la presenza dei sei esoni codificanti il gene *PPARG*. In basso è mostrato l'allineamento tra la CDS del gene *PPARG* di *Podarcis sicula* con il DNA genomico di *Anolis carolinensis* per il riconoscimento delle sequenze donatore e accettore di *splicing*, utili per la predizione della struttura introne/esone dei geni.

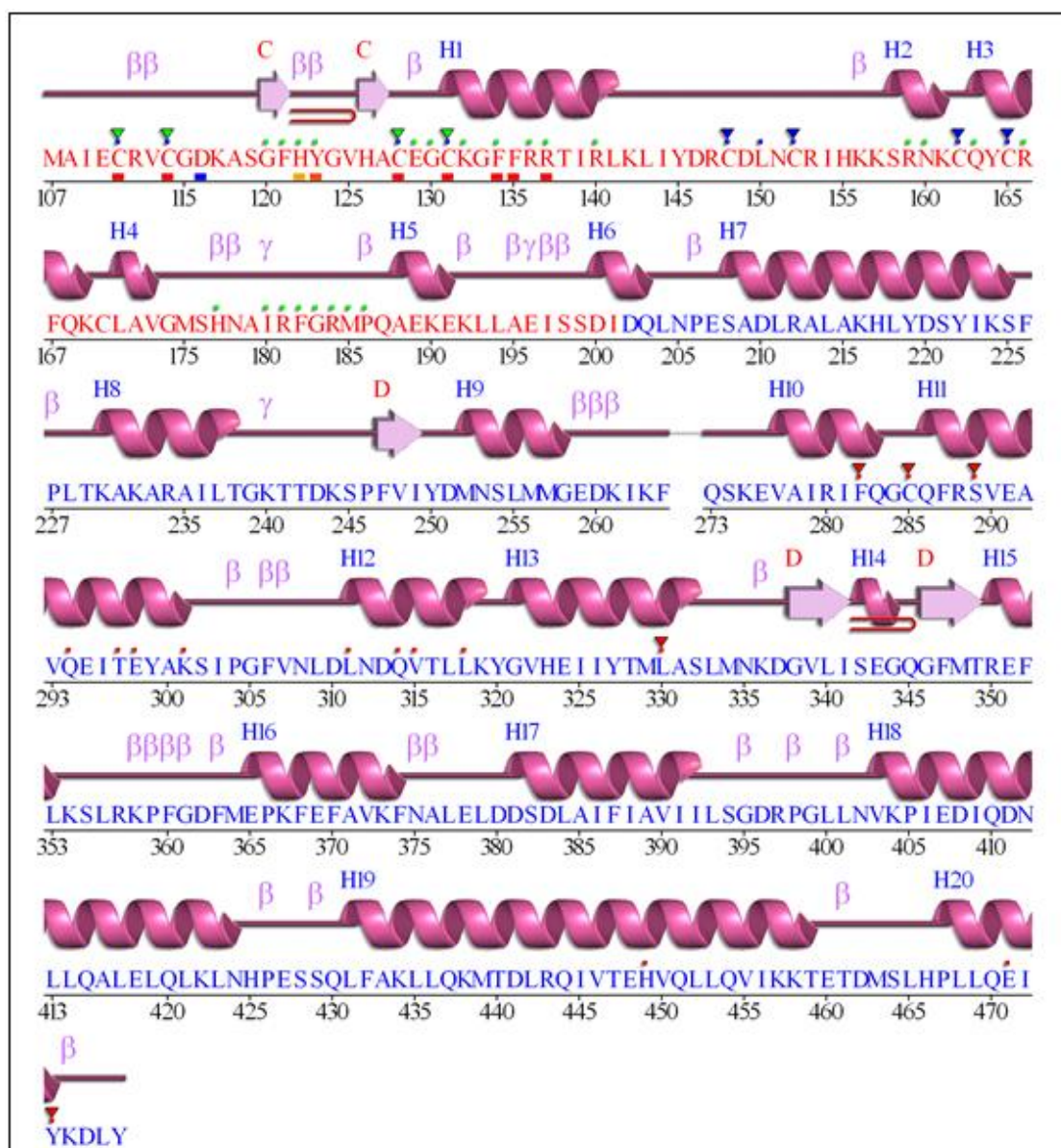


**Figura 39:** Rappresentazione grafica, mediante mVISTA, del gene *PPARG* di *Podarcis sicula* vs il DNA genomico di *Anolis carolinensis*. Asse x: lunghezza della sequenza (circa 35kb); asse y: percentuale di identità di sequenza (100%). I numeri indicano i sei esoni codificanti il gene *PPARG* conservati in *Podarcis sicula*.



**Figura 40:** Putativa struttura introne/esone del gene *PPARG* di *Podarcis sicula*.





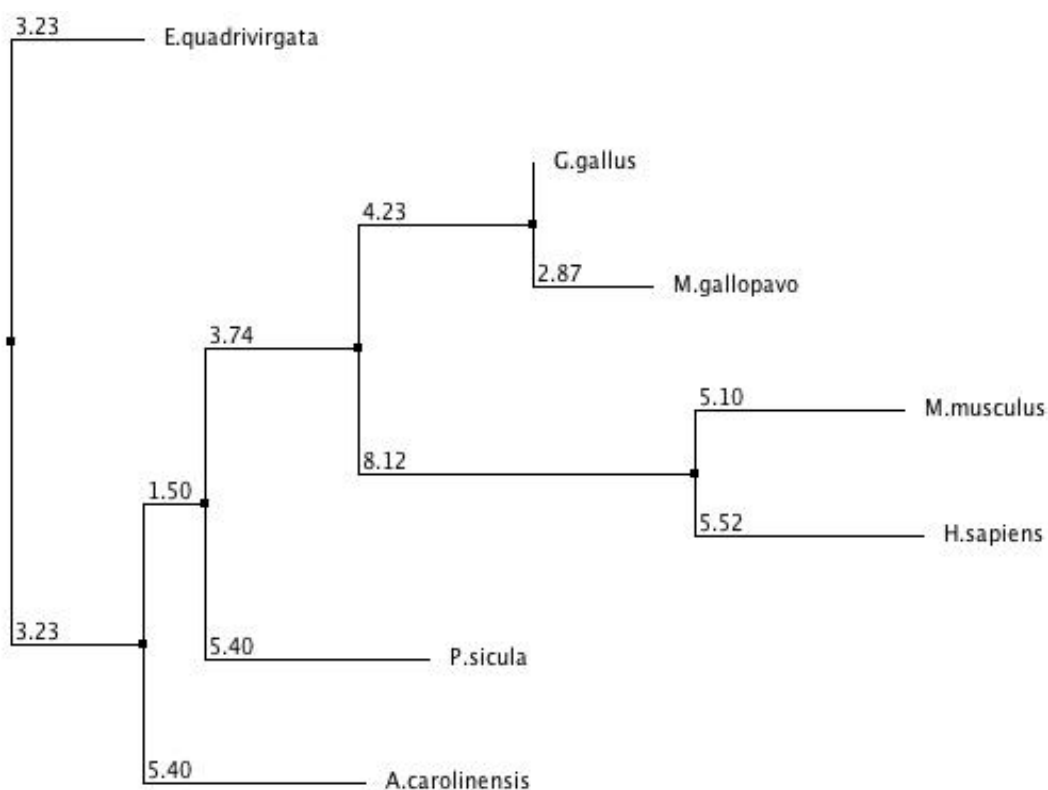
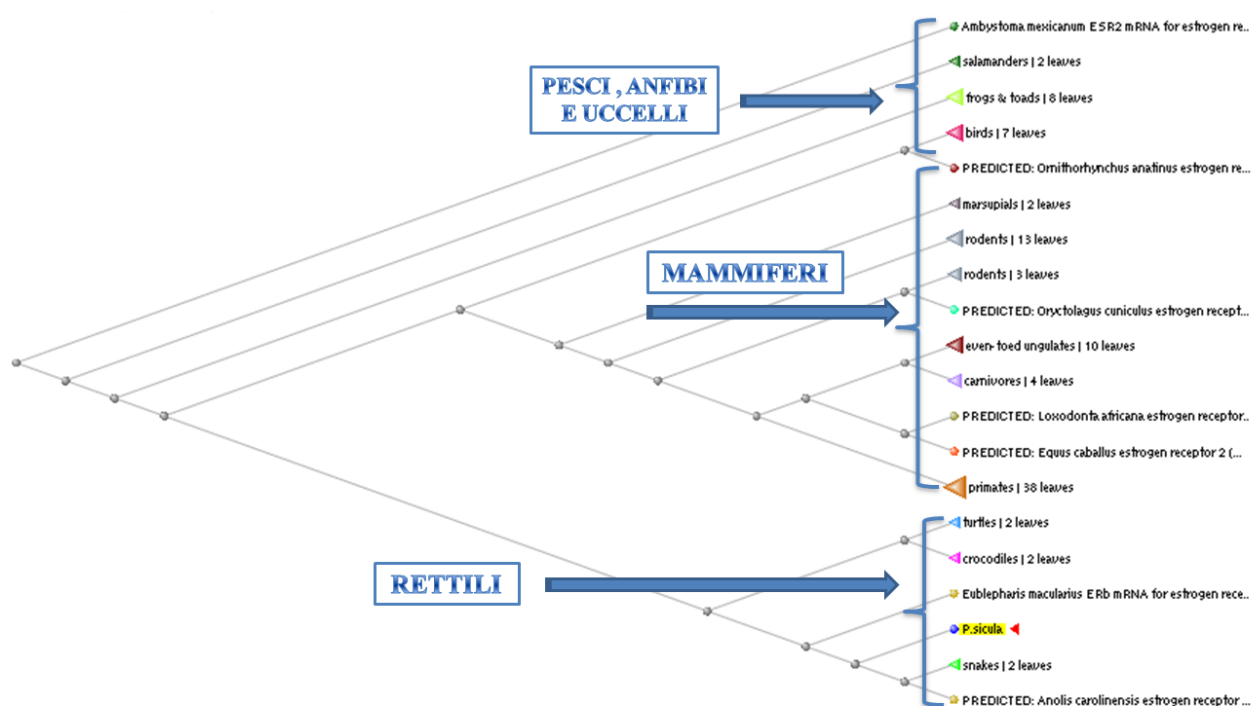
**Figura 42:** Predizione della struttura secondaria del recettore PPAR $\gamma$  in *Podarcis sicula* (461 a.a.).



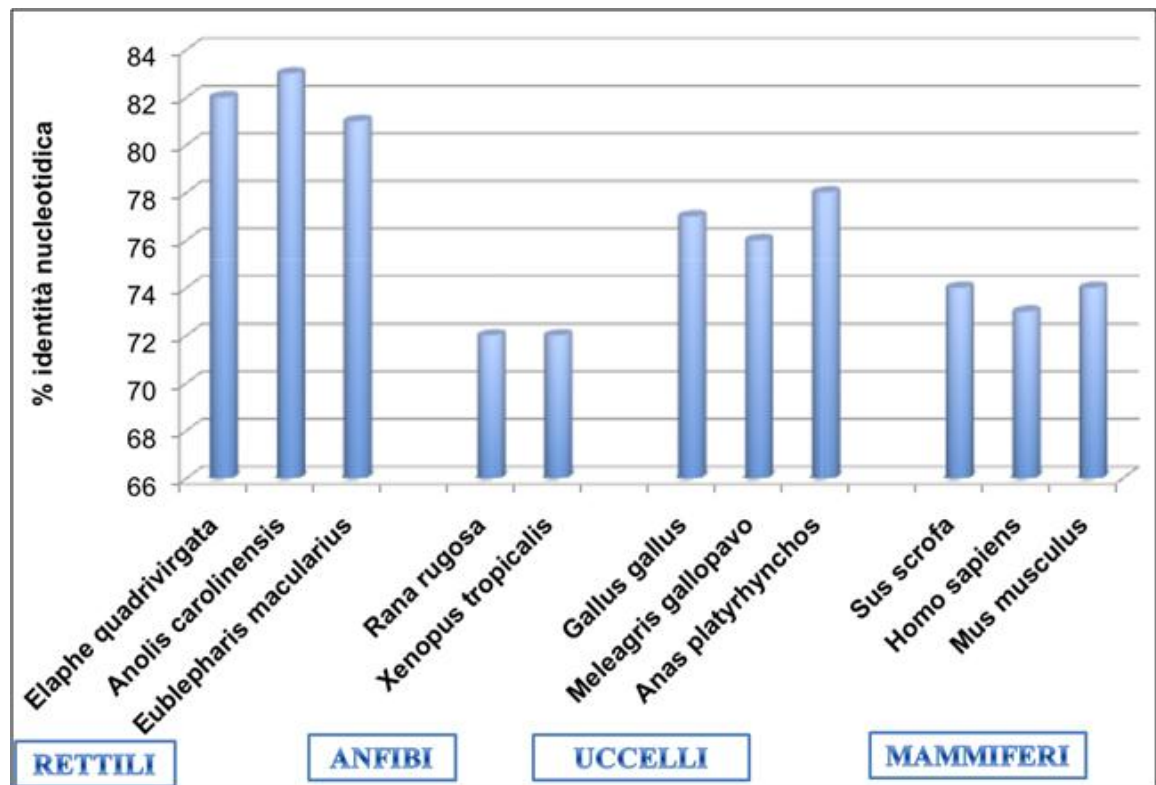
ESR2	SPECIE	Identità (nt)	Lunghezza (nt)	ID accesso gene (NCBI)	Identità (aa)	Num. aa	Prot. ID (NCBI)
Vertebrati	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	82%	1659	AB548297.1	85%	552	BAJ15428
	<i>Anolis carolinensis</i>	83%	1668	XM003214282	86%	555	XP003214330.1
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	81%	1659	AB548296.1	85%	552	BAJ15427.1
	<i>Eublepharis macularius</i>	81%	2028	AB240529.1	85%	501	BAE79509.1
	<i>Pseudemys nelsoni</i>	78%	1671	AB548299.1	83%	556	BAJ15430.1
	<i>Alligator mississippiensis</i>	77%	1647	AB548298.1	83%	548	BAJ15429.1
	<i>Gallus gallus</i>	77%	3539	NM_204794.1	83%	472	NP990125.1
	<i>Meleagris gallopavo</i>	76%	1644	XM003206778.1	79%	540	XP003206826.1
	<i>Coturnix japonica</i>	77%	1419	AF045149.2	83%	472	AAC36463.2
	<i>Sturnus vulgaris</i>	74%	3163	AF113513.1	77%	554	AAD56593.1
	<i>Loxodonta africana</i>	75%	1612	XM003408703.1	77%	528	XP003408751.1
	<i>Hynobius tokyoensis</i>	74%	1662	AB524911.1	70%	553	BAJ05028.1
	<i>Taeniopygia guttata</i>	73%	1665	XM002200595.1	77%	554	XP002200631.1
	<i>Anas platyrhynchos</i>	78%	1085	EF621308.1	84%	362	ABR10298.1
	<i>Sus scrofa</i>	74%	1581	NM001001533.1	76%	526	NP001001533.1
	<i>Cavia porcellus</i>	74%	1650	XM003472336.1	76%	549	XP003472384.1
	<i>Cervus elaphus</i>	73%	1584	GQ253124.1	77%	527	ACT33952.1
	<i>Bos taurus</i>	74%	1611	NM_174051.3	76%	527	NP776476.2
	<i>Mus musculus</i>	73%	1769	BC145329.1	76%	549	AAI45330.1
	<i>Homo sapiens</i>	73%	2169	NM_001437.2	76%	530	NP001428.1
	<i>Pan troglodytes</i>	73%	2176	XM001170310.1	76%	530	XP001170310.1
	<i>Macaca mulatta</i>	73%	1796	XM001101433.1	77%	530	XP001101433.1
	<i>Rattus norvegicus</i>	73%	2555	NM_012754.1	78%	485	NP036886.1
	<i>Rana rugosa</i>	72%	2497	FJ828859.1	70%	549	ACZ51368.1
	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	72%	2066	NM001040012.1	70%	548	NP001035101.1

**Tabella 5:** Percentuali di identità nucleotidiche ed amminoacidiche per il gene *ESR2* identificato in *P.sicula*.





**Figura 43:** Alberi filogenetici per il gene *ESR2* di *Podarcis sicula*. In alto (NCBI), algoritmo utilizzato: *Fast Minimum Evolution*, in basso (Jalview), -con un numero minore di specie-, *Neighbour joining tree*.



**Figura 44:** Conservazione della regione codificante (CDS) del gene *ESR2* di *Podarcis sicula* in quattro classi di vertebrati.

G.gallus	-----	
M.galoppavo	ATGGCTCTTGAATCAAAATGTCCCTCTGTGCGTCTTCTCACAAGGACTTTTCTCAGTTG	60
P.sicula	-----ATGTCCCCTTCGTGCATCATCTCACAAGGAGT-----TG	34
E.quadrivirgata	-----ATGTCCC-TCTGTGCATCATCTCACAAGGAATGTTCTCATTG	42
A.carolinensis	-----ATGTCCC-TCTGTGCCTCGTCTCACAAGGAATGTTCTCACTTG	42
M.musculus	-----ATGTCCA-TCTGTGCCTCTTCTCACAAGGATTTTCTCAGCTG	42
H.sapiens	-----	
G.gallus	-----	
M.galoppavo	CTGCCAC---TTCAGGATATTGGATGCAGTAAGACAGAAATTA AAAACTCACCTGCTGGT	117
P.sicula	CCACCAA---TCCAAGATCTCGTATGTACCAAAGCAGAAGTGAAAAGCTCCCTCTCCGAG	91
E.quadrivirgata	CCACCAA---TTCAAGAACTCGCATGTAGTAAAAGAGAAGCCAAAAGCGCCATCTCTGAG	99
A.carolinensis	CTACCGTCGCTTCAAGATCACGGATGTAGCAAAACGGAAGTAAAGAGCTCCTTGTCCGAG	102
M.musculus	AGACCTA---CGCAAGAC-----ATGGAGATCAAAAACCTCACCATCAAGC	84
H.sapiens	-----ATGGATATAAAAAACTCACCATCTAGC	27
G.gallus	-----	
M.galoppavo	ATTGGCTCTCCAG---TTCCTACAGCTGTAATCAGTCTGCACTGACAACAGAACACAGT	174
P.sicula	CTGGTCTCTCCTG---TCCCTTTAGCTGCAGCCAGTCTGCTTTGAGCCTTGAGCACAGC	148
E.quadrivirgata	CAGAGCTCTTCCA---TCCCTTTAGCTGCAGCCAGGCTGCTCTGACTGTGGAACACAGC	156
A.carolinensis	CTTGGCTCTCCTGCCATCCCTTTAGCTGCAGCCCTTCTGCCCTCACCCTCGAGCACAGT	162
M.musculus	CTTACTTCCCTG---CTTCTTATAACTGTAGCCAGTCCATCCTACCCTTGGAGCATGGT	141
H.sapiens	CTTAATTCTCCTT---CCTCCTACAACTGCAGTCAATCCATCTTACCCCTGGAGCACGGC	84
G.gallus	-----ATGGCATTTC	9
M.galoppavo	CCGATCTACATCCCTTCGTCTTATGTGGAAAACAGGCATGAATATTCTGCAATGGCATTTC	234
P.sicula	CCAATTTACATCCCATCCTCTTATATGGAAAACAGGCATGAGTATCCGGCCATGACATTTC	208
E.quadrivirgata	CCGATCTACATTCCATCCTGTTATATGGAGAACAGACCCGACTACTCAGCCATGGCTTTC	216
A.carolinensis	CCGATTTACATCCCTTCCTCTTACATGGAGAACAGGCATGACTATTCCGCCATGGCCCTTC	222
M.musculus	CCCATCTATATCCCTTCCTCTATGTAGAGAGCCGTCACGAATACTCAGCCATGACATTTC	201
H.sapiens	TCCATATACATACCTTCCTCTCTATGTAGACAGCCACCATGAATATCCAGCCATGACATTTC	144
	*** * ***	
G.gallus	TGCAGTCC---TGCTATGCTGAATTACAACATAGCCAGCAATTTTGGTGATTCTGAGAGT	66
M.galoppavo	TGCAGTCC---TGCTATGATGAACATAACATAGCCAGCAATTTTGGTGATTCTGGAGAGT	291
P.sicula	TACACCCC---CGCTATGATGAACATACAGCATTCCAAGCACTTTCGGCGACTCGGAAAGC	265
E.quadrivirgata	TACAGCCC---TTCGATGATGAATTATAACATTCCGGCCAATTTAGCGATTTCAGAAAAT	273
A.carolinensis	TACACCCCGGCTGCCATGATGAACATAACATCCCTGGCAACTTCAGCGATTTCAGAGAGC	282
M.musculus	TACAGTCC---TGCTGTGATGAACATACAGTGTTCACGAGCAGCCGTAACCTGGAAGGT	258
H.sapiens	TATAGCCC---TGCTGTGATGAATTACAGCATTCCAGCAATGTCACTAACTTGGAAAGGT	201
	* * * * *	
G.gallus	GCATCTGTGAGGCAACATCGAGCCCAAGCGTGTATGGTCTGCTCCTGGCCACCTCTCT	126
M.galoppavo	GCATCTGTGAGGCAGACATCGAGCCCAAGTGTGTATGGTCTGCTCCTGGCCATCTCTCC	351
P.sicula	GCCTCTCTCAGACAGTCAGCCAGCCGAGCATGTTATGGTCTGGTTCTGACCACATCTCT	325
E.quadrivirgata	GCCACTTTAAGGCAGGCGGCGAGTCCGAGCATGTTGTGGTCCAGTCTGGTCACATCTCT	333
A.carolinensis	ACGGCCCTGAGGCAGACAGCAAGCCCAAGCATGTTGTGGTCAGGCCCTGGCCACATCTCT	342
M.musculus	GGGCCTGTTTCGCCAGACTGCAAGCCCAATGTGCTATGGCCAACTTCTGGACACCTCTCT	318
H.sapiens	GGGCCTGGTCGGCAGACCACAAGCCCAATGTGTTGTGGCCAACACCTGGGCACCTTTCT	261
	* * * * *	
G.gallus	CCTCTGACACTGCACTGTCACTCATCACTTCTGTATGCAGAGCAGCCTAAGAGCCCGTGG	186
M.galoppavo	CCTCTGACACTGCACTGTCACTCATCACTTCTGTATGCAGAGCAGCCTAAGAGCCCGTGG	411
P.sicula	CCTTTGACTTTACACTGCCAGTCGTCGGTTTTATTTGCAGAGCAACCAAAAAGCCCGTGG	385
E.quadrivirgata	CCTCTGACAGTACACTGCCAATCGTCAGTTTTATATGCAGCAACCAAAAAGCCCTTGG	393
A.carolinensis	CCTTTGACCTTACATTGCCAGTCCTCAGTTTTATATGCTGAGCAACCAAAAAGCCCATGG	402
M.musculus	CCTTTAGCCACCCACTGCCAATCATCGCTTCTCTATGCAGAACCTCAAAAGAGTCCTTGG	378
H.sapiens	CCTTTAGTGGTCCATCGCCAGTTATCACATCTGTATGCGGAACCTCAAAAGAGTCCTTGG	321
	*** * * * *	

**Figura 35:** Allineamento multiplo tra le regioni codificanti il gene *ESR2* mediante il programma CLUSTAL W –continua nella pag. successiva-











```

G.gallus      CACCACCTGCTCAATGTGGTCACAGATGCTCTGGTGTGGGTTATTGCAAAGAGCGGAATC 1191
M.galloppavo CACCACCTGCTCAGTGTGGTCACAGATGCTCTGGTGTGGGTTATTGCAAAGAGTGGAATC 1416
P.sicula      AGTCACCTGCTGAACTCTGTGACGGACGCTTTGGTGTGGGTCATTTCAAAGAGCGGGGTC 1405
E.quadrivirgata AGCCATTTGCTAAACTCAGTGACAGATGCGTTGGTGTGGGTCATTGCAAAGAGTGGGGTC 1413
A.carolinensis AACCACTTGCTCAACTCTGTGACTGATGCCTTGGTGTGGGTCATTGCAAAGAGTGGAATT 1422
M.musculus    ACACACCTATTGAACGCAGTGACAGATGCCCTGGTCTGGGTGATTTGCAAAGAGTGGAATC 1395
H.sapiens     GCTCACTTGCTGAACGCCGTGACCGATGCTTTGGTTTGGGTGATTGCCAAGAGCGGCATC 1338
              ** * * * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * *

G.gallus      CCCTCCCAGCAGCAAACAACTCGCCTGGCCAATCTGTTGATGCTGCTCTCCCATGTCAGA 1251
M.galloppavo CCCTCCCAGCAGCAAACAACTCGCCTGGCCAATCTGTTGATGCTGCTCTCCCACGTCAGA 1476
P.sicula      CCTTTGGCCCAACAGACGACAGCTTGGCGAACTTGCTGATGCTGCTCTCATATGTCGGG 1465
E.quadrivirgata CCTTTACCCCAACAAACAACTCGCTTGGCAAATTTGTTGATGTTACTTTCTCATGTTCCG 1473
A.carolinensis CCCTTGCCACAACAGACAACCTCGCCTGGCAAATTTGCTCATGCTGCTTTTCATGTCAGG 1482
M.musculus    TCTTCCCAGCAGCAGTCAGTCCGCTCTGGCCAACCTCCTGATGCTTCTTTCTCATGTCAGG 1455
H.sapiens     TCCTCCCAGCAGCAATCCATGCGCCTGGCTAACCTCCTGATGCTCCTGTCCACGTCAGG 1398
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

G.gallus      CATGCAAGTAATAAGGGCATGGAGCATCTGCTGAGCATGAAGTGCAAAAATGTGGTCCCG 1311
M.galloppavo CATGCAAGTAACAAGGGCATGGAGCATCTGCTGAGCATGAAGTGCAAAAATGTGGTCCCA 1536
P.sicula      CACGCAAGCAACAAGGGATGGAGCACCTTCTCAGCATGAAGTGCAATAATGTCGTA-- 1522
E.quadrivirgata CATGCAAGTAACAAGGGATGGAGCATCTTCTTAGTATGAAGTGCAAGAATGTAGTACCA 1533
A.carolinensis CACGCAAGTAACAAGGGATGGAGCACCTTCTTAGCATGAAGTGTAAGAATGTGGTCCCC 1542
M.musculus    CACATCAGTAACAAGGGCATGGAACATCTGCTCAGCATGAAGTGCAAAAATGTGGTCCCG 1515
H.sapiens     CATGCGAGTAACAAGGGCATGGAACATCTGCTCAACATGAAGTGCAAAAATGTGGTCCCA 1458
              ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

G.gallus      GTGTATGACTTGTGCTGGAGATGTTGAACGCGCACACGCTCCGAGGGCAGAGGAAGTCC 1371
M.galloppavo GTGTATGACTTGTGCTGGAGATGTTGAATGCGCACACACTCCGAGGGCAAAGGAAGTCC 1596
P.sicula      -----
E.quadrivirgata GTCTACGATTTGTTGCTGGAGATGCTCAATGCTCACACTGTCCGACGCCACAAGAAAACA 1593
A.carolinensis GTCTATGACTTGTGCTGGAAATGCTCAATGCTCATACTGTCCGAAATCACAGGAAAACA 1602
M.musculus    GTGTACGACCTGCTGCTGGAGATGCTGAATGCTCACACGCTTCGAGGGTACA--AGTCC 1572
H.sapiens     GTGTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGAATGCCACGCTGCTTCGCGGGTGCA--AGTCC 1515

G.gallus      CCCGTCACACATCCTGAG-----TTTGAACAAGTTTCAC-----ATTTCAG 1413
M.galloppavo CCAGTCACACATCCTGAG-----TTTGAATA----- 1623
P.sicula      -----
E.quadrivirgata CCCGTCTCCAATCTTGAGAATAGCCCATTTGGAACCAGCAGAGACAACAGATGAAGTCCAG 1653
A.carolinensis CCCATTTCCAATCTGGAGATTAGCCCGTCAGAACAAACAGAGACGACAGATGGCATGCAA 1662
M.musculus    TCAATCTCGGGGTCTGAGTGCTGCTCGACAGAGGACAGTAAGAGCAAAGAGGGCTCCAG 1632
H.sapiens     TCCATCACGGGGTCCGAGTGACGCCCGCAGAGGACAGTAAAGCAAAGAGGGCTCCAG 1575

G.gallus      -----GTCTGA 1419
M.galloppavo -----
P.sicula      -----
E.quadrivirgata -----CAGTGA 1659
A.carolinensis -----CTCTGA 1668
M.musculus    AACCTCCAGTCACAGTGA 1650
H.sapiens     AACCCACAGTCTCAGTGA 1593

```

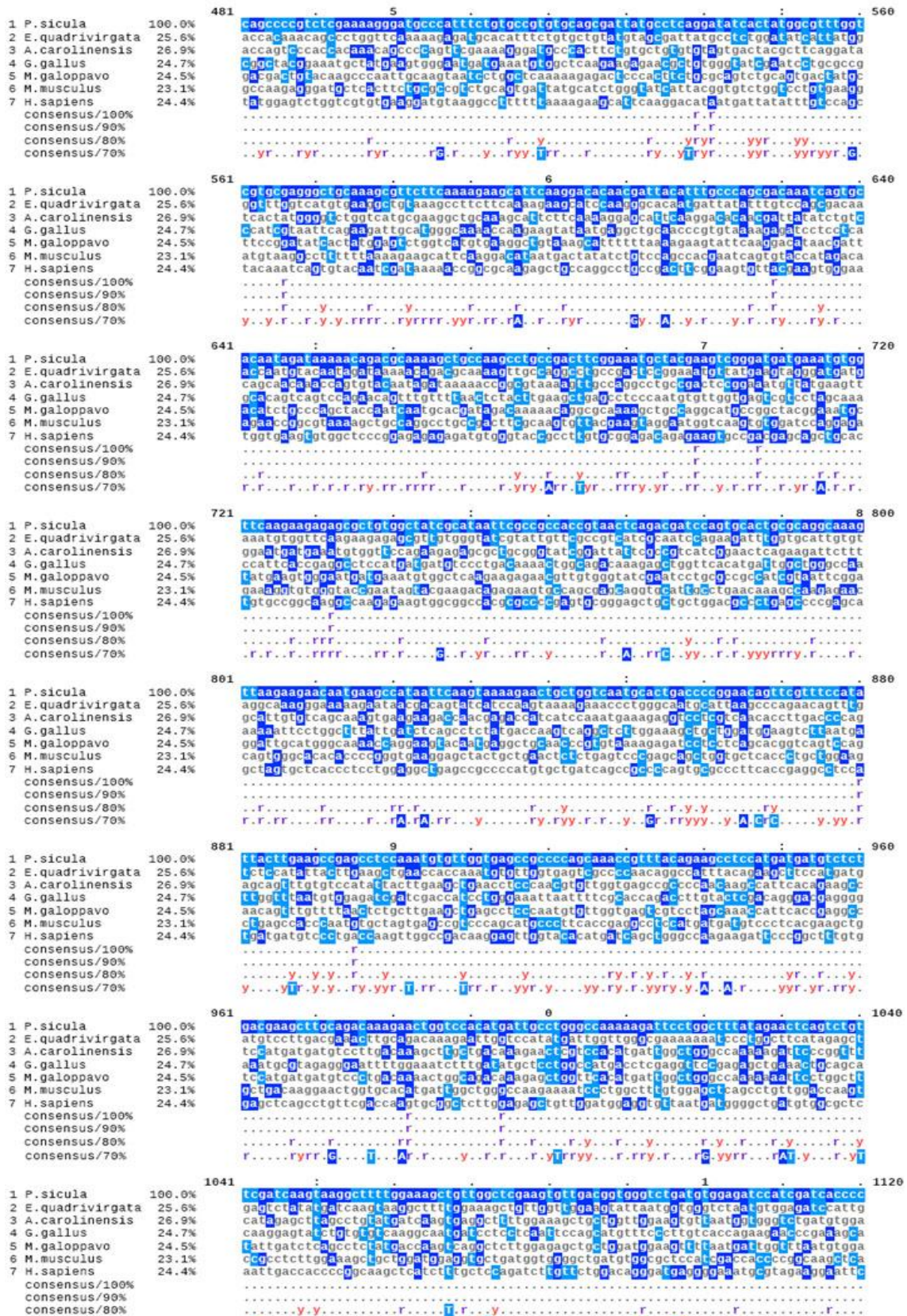
**Figura 45:** Allineamento multiplo tra le regioni codificanti il gene *ESR2* mediante il programma CLUSTAL W.









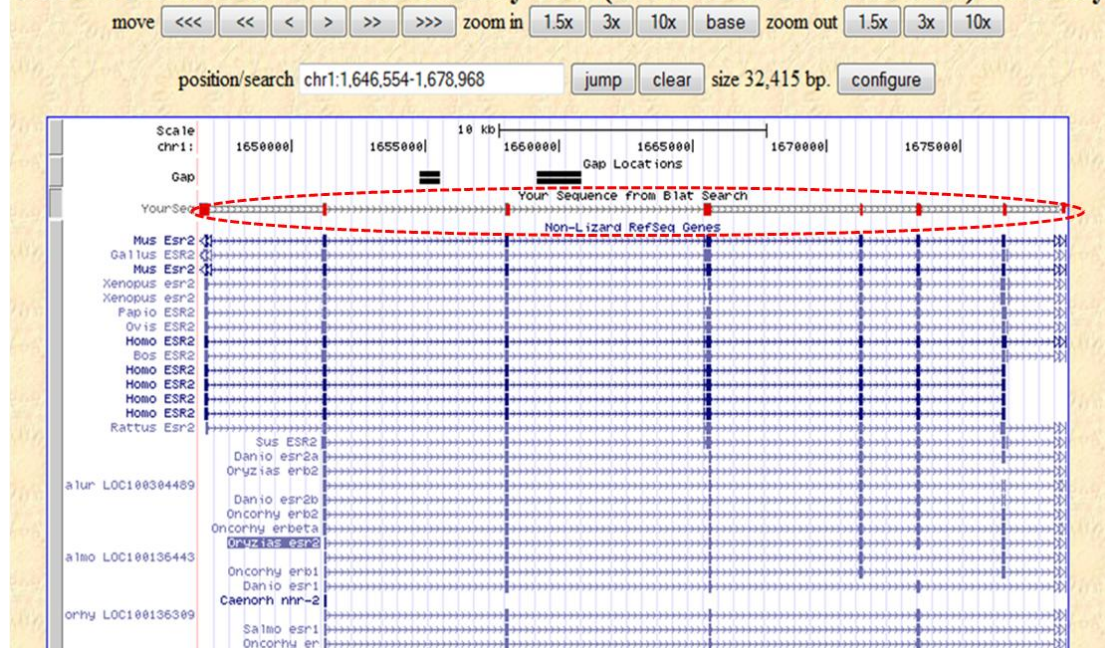


**Figura 47:** Allineamento multiplo (specie di riferimento *P. sicula*) tra le CDS del gene *ESR2* mediante il programma mView –continua nella pag. successiva–





## UCSC Genome Browser on Lizard May 2010 (Broad AnoCar2.0/anoCar2) Assembly



### Alignment of Podarcis

[Podarcis](#)

[Lizard chr1](#)

[block1](#)

[block2](#)

[block3](#)

[block4](#)

[block5](#)

[block6](#)

[block7](#)

[block8](#)

[together](#)

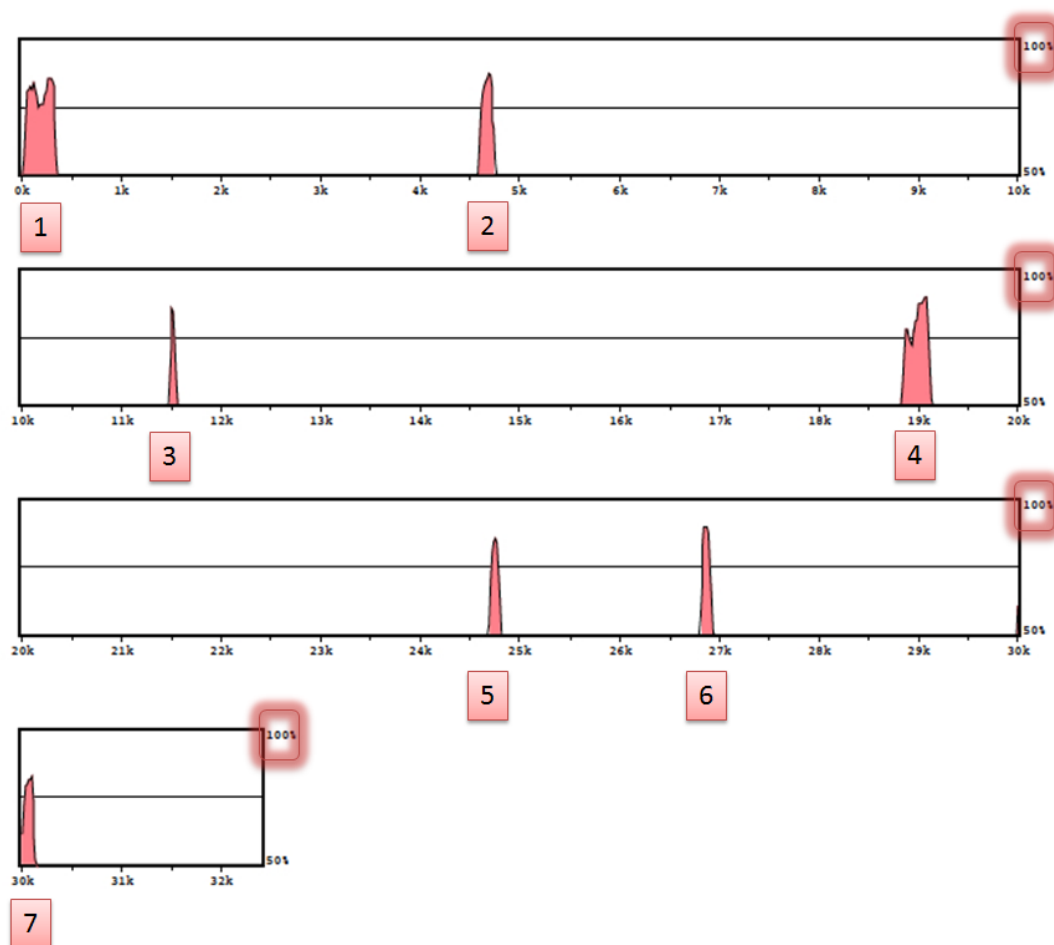
### cDNA Podarcis

```

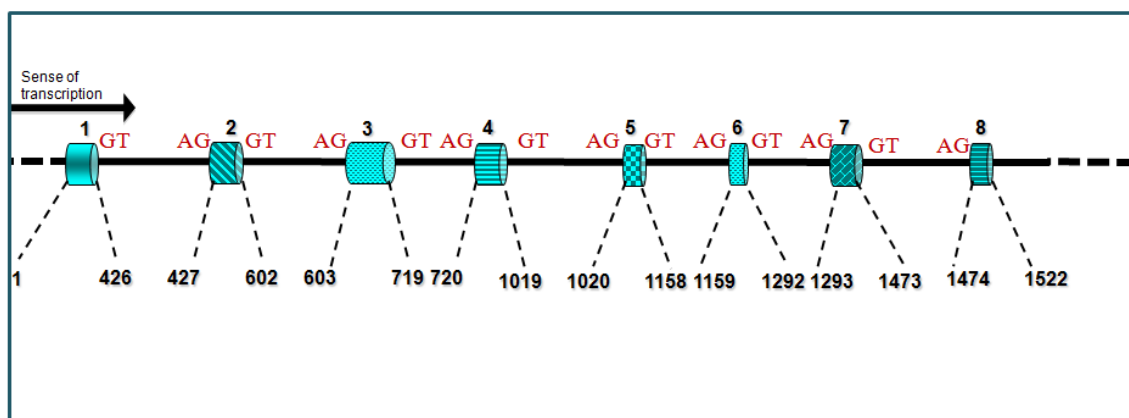
atgtccccctt cgtgcatcat ctcacaagga gttgccacca atccaagatc 50
tcgtatgtac caaagcagaa gtgaaaAGCT CCCtTCCGA GCTgGtCTCT 100
CCTGTCCCTT TCAGCTGCAG CCagTCTGCT tTgAgCcTtG AGCAGAGCC 150
aATTACATC CcATCCTCTT AtATGGAAaA CAGGCATGag TATcCgGCCA 200
TGaCaTTCTA CACCCCGCTT ATGATGAAC ACAGCATtCC aaGCAcTTC 250
gGCGAcTCgG AaAGCgCctc tCTcAGAcAG tCAGCcAGCC CgAGCATGTT 300
aTGGTCTGGT tCTGAcCACA TCTCTCTTT GAcTTACAc TGCCAGTCgt 350
CcGTTTTATt TGCAGAGCAA CcAAAAGCC CgTGGTGCgA aGCAAGACCC 400
ggGGATCATG cCcTtCCTAT GCACAgagaa acgctgaaaa gaaaagccag 450
cagcaacgac TGTACCAGcC CcTCCAtAAA CAGCCCCgtc TCGAAAAGGG 500
ATGCCCAATt CTGTGCcGTG TGcAGcGAtT AtGCcTCAGG ATATCACTAT 550
GGcGtTGGT CgTGGGAgGG CTGCAAGCG TTCTTCAAAA GaAGCAITCA 600
AGGACACAAC GATTAcAtTt GcCCAGCgAC AAAtCAGTgc ACAATAGATA 650
AAAAcAGcG cAAAAGcTGC CAAGCCTGCC GACTtCGGAA ATGcTAcGAA 700
GTCGGgATGA TGAATGTGG TTCAAGAAGA GAGCGCTGtG GcTATCGcAT 750
aATTGCCGcC CAcCGtAACT CAGAcGATcC agTGCAcTgc GcagGCAaAG 800
TtAAGAAGAA CAAtGAagCC ATaATtCAAG TaAAAGAAcT gCTgGTCAAt 850
gCacTGACCC CgGAaCAGTT cGtTCCATA TTACTTGAAG CcGAAGCCTCC 900
aAAtGTGTTG GTGAGCCGCC CcAGCAAAcC gTTtACAGAA GCCTCCATGA 950
TGATGTCTct GAcgAAGCTT GCAGACAAG AACTgGTCCA CATGATTGcC 1000
TGGGCCAAAA AGATTCTctg ctttatagaa ctcagtctgt tcGATCAAGT 1050
aAGGCTTTTG GAAAGCTGtT GGCtCGAAGT GTTgAcGGTG GGTCTGATGT 1100
GGAGATCCAT cgatcacccc ggcaagctca tcttcgccc agatctcgta 1150
ctcgacaggg atgaaGGGAA ATGtGTGGAA GGAATTTTGG AAATCTTTGA 1200
CATGCTCTTG GCgACgACTg CAAGgCTcCG gGAGCTGAAA TTGCAGCACA 1250
AgGAATATaT tTGTGTCAAG GCcATGATCC TcCTCAATTC CAatagtctc 1300
ccagtctctc cagctgcagg agagtccgag agcaacaaga aactgagtca 1350
ccTGCTgAAC TCTGTGACgG AcGctTTGTT GTGGGTCAAT tCaAAGAGcG 1400
GGGTcCCTtT GgCcCAACAG AcGAcACGCT TGGGgAAcTT GCTgATGCTG 1450
CTcTCACATG TccGGCACGC AAGcACAAA GGGATGGAGC ACCTTCTcAG 1500
CATGAAGTgc aataatgtcg ta

```

**Figura 48:** In alto, allineamento tramite BLAT (UCSC, University of California, Santa Cruz) dell'mRNA di *Podarcis sicula* vs il DNA genomico del gene *ESR2* in diversi organismi. In rosso è evidenziata la sequenza di *Podarcis sicula* che mostra la presenza degli otto esoni codificanti il gene *ESR2*. In basso è mostrato l'allineamento tra la CDS del gene *ESR2* di *Podarcis sicula* con il DNA genomico di *Anolis carolinensis* per il riconoscimento delle sequenze donatore e accettore di *splicing*, utili per la predizione della struttura introne/esone dei geni.



**Figura 49:** Rappresentazione grafica, mediante mVISTA, del gene *ESR2* di *Podarcis sicula* vs il DNA genomico di *Anolis carolinensis*. Asse x: lunghezza della sequenza (circa 35kb); asse y: percentuale di identità di sequenza (100%). I numeri indicano gli esoni codificanti il gene *ESR2* conservati in *Podarcis sicula*.



**Figura 50:** Putativa struttura introne/esone del gene *ESR2* di *Podarcis sicula*.



```

M S P S C I I S Q G V A T N P R S R M Y Q S R S E K L P L R
5' ATGTCCCTTCTGTGCATCATCTCACAAGGAGTTGCCACCAATCCAAGATCTCGTATGTACCAAGCAGAAAGTGAAGAGTCCCTCTCCGA 90
>>>.....>>>.....

A G L S C P F Q L Q P V C F E P * A Q P N L H P I L L Y G K
5' GCTGGTCTCTGTGTCCCTTTGAGTGCAGCCAGTCTGCTTTGAGCCTTGAGCAGACCCCAATTTACATCCCATCCTCTTATATGAAAA 180
.....>>>.....

Q A * V S G H D I L H P R Y D E L Q H S K H F R R L G K R L
5' CAGGCATGAGTATCCGGCCATGACATTCTACACCCCGCTATGATGAACACAGCATTCCAAGCACTTTCCGGCACTCGGAAAGCGCCTC 270
.....>>>.....

S Q T V S Q P E H V M V W F * P H L S F D F T L P V V R F I
5' TCTCAGACAGTGCAGCCAGCCCGAGCATGTTATGGTCTGCTTCTGACACATCTCTCCTTTGACTTTACACTGCCAGTCGTCCGCTTTTATT 360
.....>>>.....>>>.....>>>.....

C R A T K K K P V V R S K T R G S C P S Y A Q R N A E K K S Q
5' TGCAGAGCAACCAAAAAGCCCGTGGTGCAGCAAGACCCGGGATCATGCCCTTCTATGCACAGAGAACCGCTGAAAGAAAAGCCAG 450
.....>>>.....

Q Q R L Y Q P L H K Q P R L E K G C P F L C R V Q R L C L R
5' CAGCAACGAGTGTACCAAGCCCTCCATAAACAGCCCGTCTCGAAAAGGGATGCCCAATTTCTGTGCCGTGTGCAGCGATTATGCGCTCAGG 540
.....>>>.....>>>.....>>>.....

I S L W R L V V R G L Q S V L Q K K H S R T Q R L H L P S D
5' ATATCACTATGCCGTTTGGTGCAGAGGCTGCAGAGCGTTCTTCAAAAGAGCATTCAAGGACACAGATTACATTGCCAGCGAC 630
.....>>>.....>>>.....>>>.....

K S V H N R * K Q T Q K L P S L P T S E M L R S R D D E M W
5' AAATCAGTGCACATAGATAAAAACAGACGCAAAAGCTGCCAAGCCTGCCAGCTTCGAAATGCTACGAAAGTCCGGATGATGAATGTGG 720
.....>>>.....>>>.....>>>.....

F K K R A L W L S H N S P P P * L R R S S A L R R Q S * E E
5' TTCAGAGAGAGCGCTGTGGCTATCGCATAAATTCGGCCGCCACCGTAACCTCAGACGATCCAGTGCAGTCGCGCAGGCAAGTTAAGAAGAA 810
.....>>>.....>>>.....>>>.....

Q * S H N S S K R T A G Q C T D P G T V R F H I T * S R A S
5' CAATGAAGCCATAATTCAAGTAAAGAACTGCTGGTCAATGCAGTACCCCGGAACAGTTCTGTTCCATATTACTTGAAGCCGAGCGCTCC 900
.....>>>.....>>>.....>>>.....

K C V G E P P Q Q T V Y R S L H D D V S D E A C R Q R T G P
5' AAATGTGTTGGTGAAGCCCGCCAGCAACCGTTTACAGAAAGCTCCATGATGATGTCTCTGACGAAGCTTGACAGCAAGAACTGGTCCA 990
.....>>>.....

H D C L G Q K D S N L Y R T Q S V R S S K A F G K L L A R S
5' CATGATTGCTGGGCAAAAAGATTCTGGCTTTATAGAAGTCACTGCTGTTGATCAAGTAAGGCTTTTGGAAAGCTGTTGGCTCGAAGT 1080
.....>>>.....>>>.....>>>.....

V D G G S D V E I H R S P R Q A H L R A R S R T R Q G * R E
5' GTTGACGGTGGTCTGATGTGGAGATCCATCGATCACCCCGGCAAGCTCATCTTCGCGCCAGATCTCGTACTCGACAGGGATGAAGGGAA 1170
.....>>>.....

M C G R N F G N L * H A L G D D C K A P G A E I A A Q G I Y
5' ATGTGTGGAAGGAATTTTGAATCTTTGACATGCTTTGGCGAGCACTGCAAGGCTCCGGAGCTGAAATTGCAGCACAGGAATATAT 1260
>>>.....>>>.....

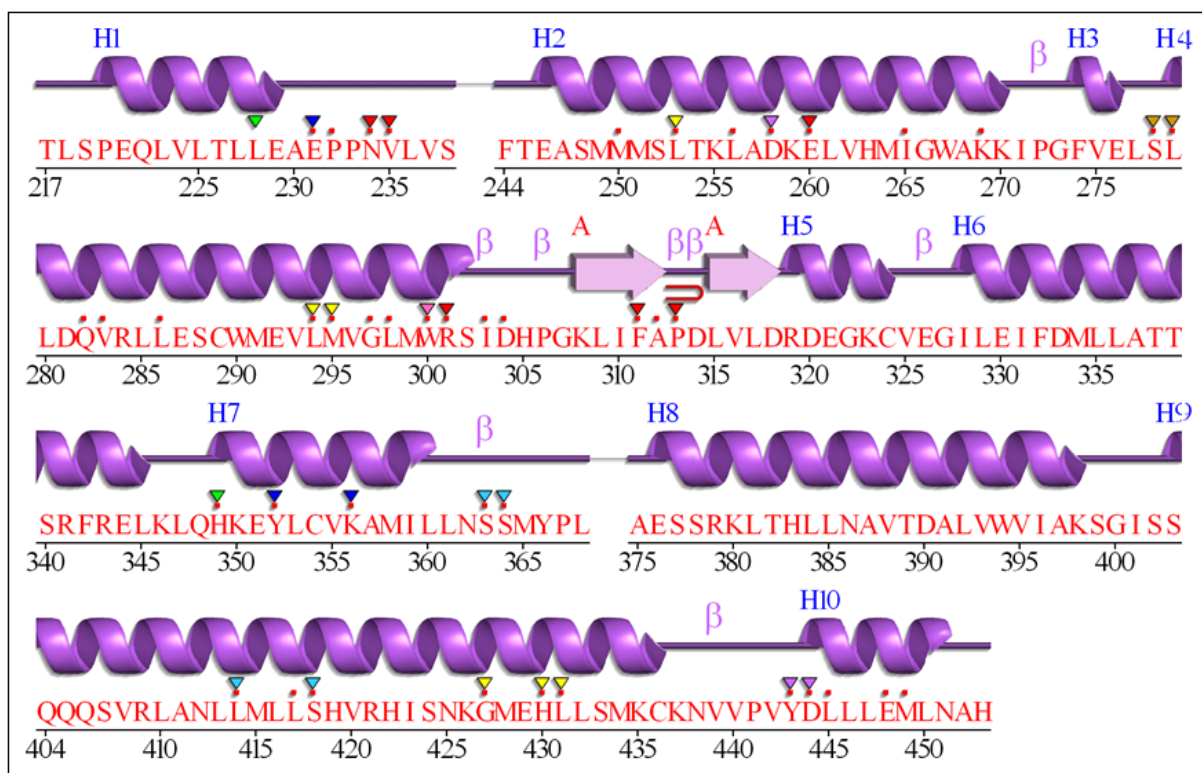
L C Q G H D P P Q F Q Y V S S L L S C R R V R E Q Q E T E S
5' TTGTGTCAAGGCCATGATCCTCTCAATTCCAATATGCTCCAGTCTCTCAGCTGCAGGAGTCCGAGAGCAACAAGAACTGAGTCA 1350
>>>.....>>>.....

P A E L C D G R F G V G H F K E R G P F G P T D D T L G E L
5' CCTGCTGAATCTGTGACGGAGCGCTTTGGTGTGGGTCAATTTCAAGAGCGGGGTCCCTTTGGCCCAACAGACGACACGCTTGGCGAATTT 1440
.....>>>.....

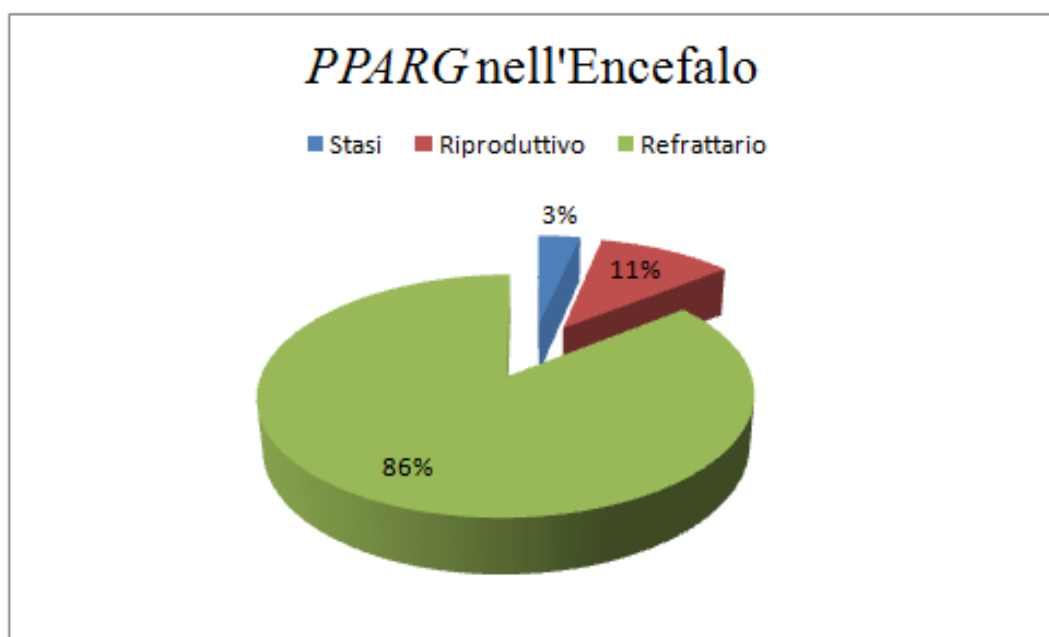
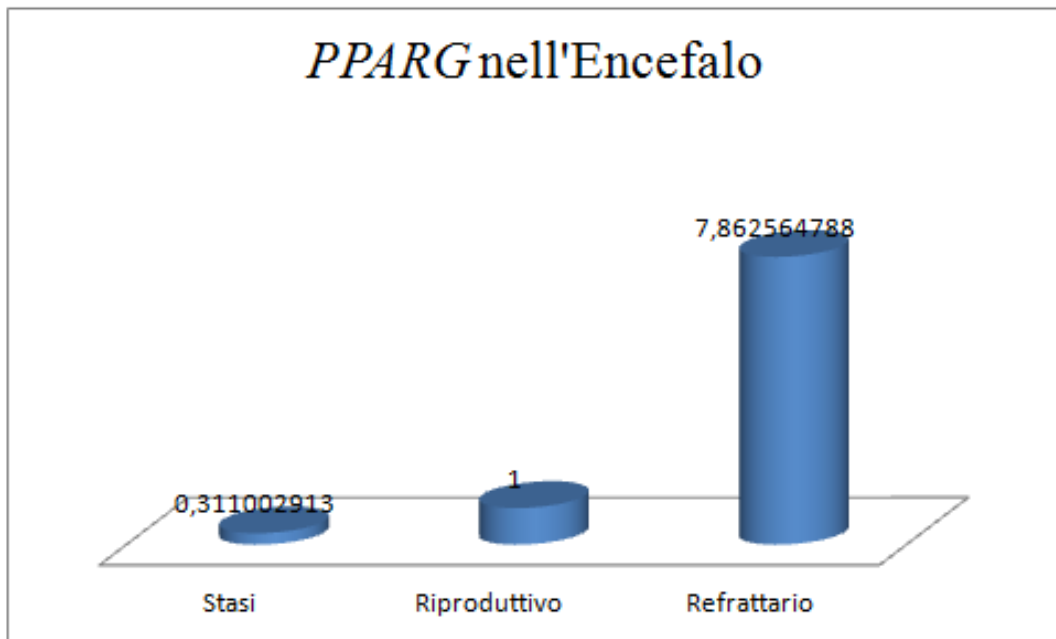
A D A A L T C P A R K Q Q R D G A P S Q H E V Q * C R
5' GCTGATGCTGCTCTCACATGTCGGGCACGCAAGCAAAAGGGATGGAGCACCTTCTCAGCATGAAGTCAATAATGTGTA 1522
.....>>>.....>>>.....

```

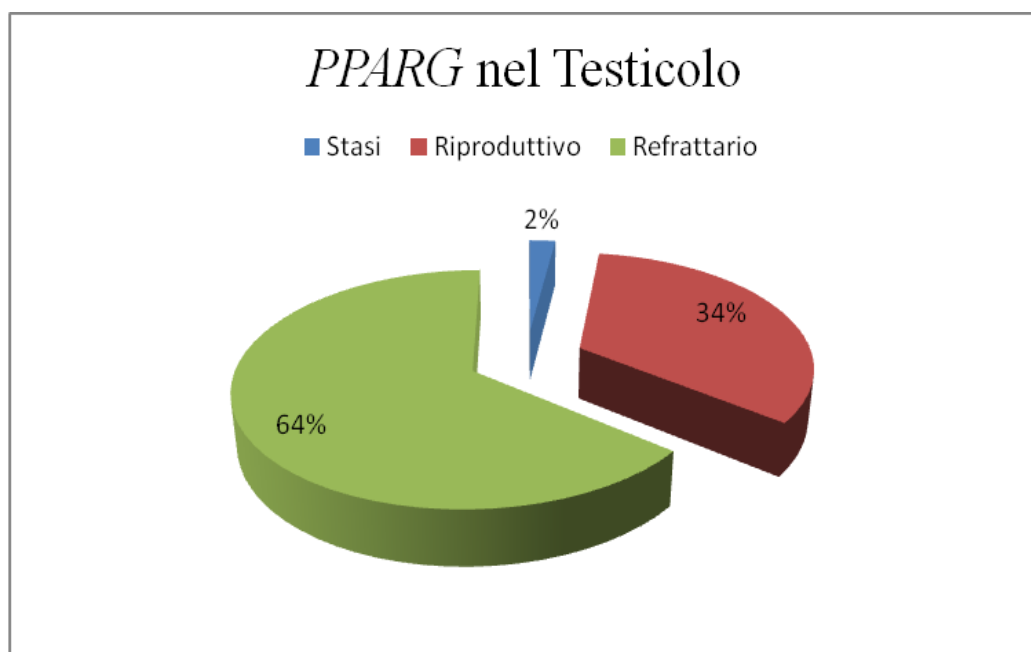
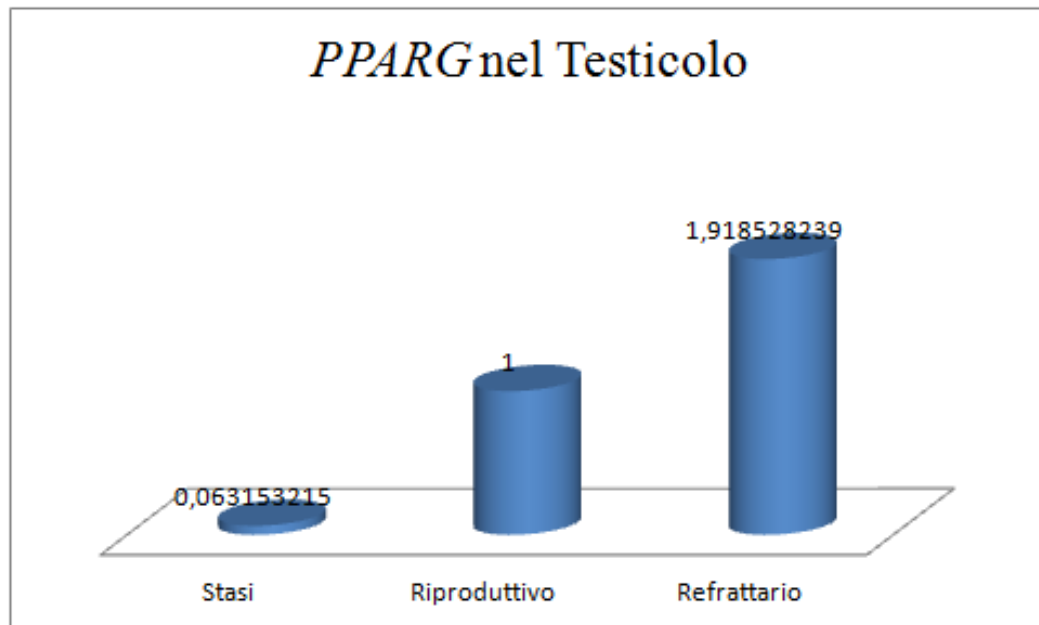
**Figura 51:** Recettore ERβ in *Podarcis sicula* (507 a.a.).



**Figura 52:** Predizione della struttura secondaria del recettore ERβ in *Podarcis sicula* (507 a.a.).

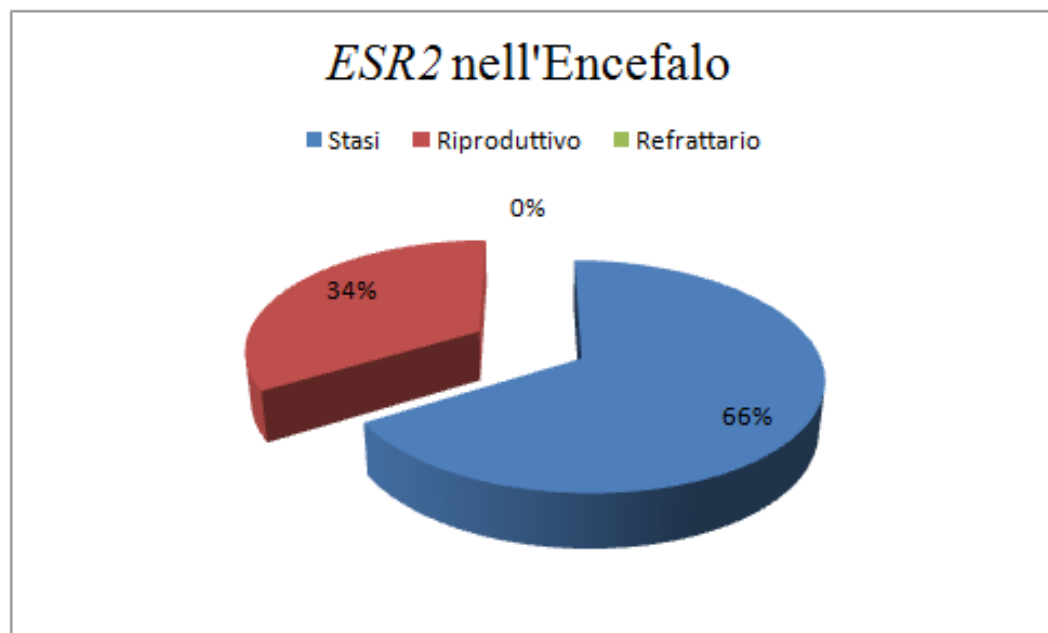
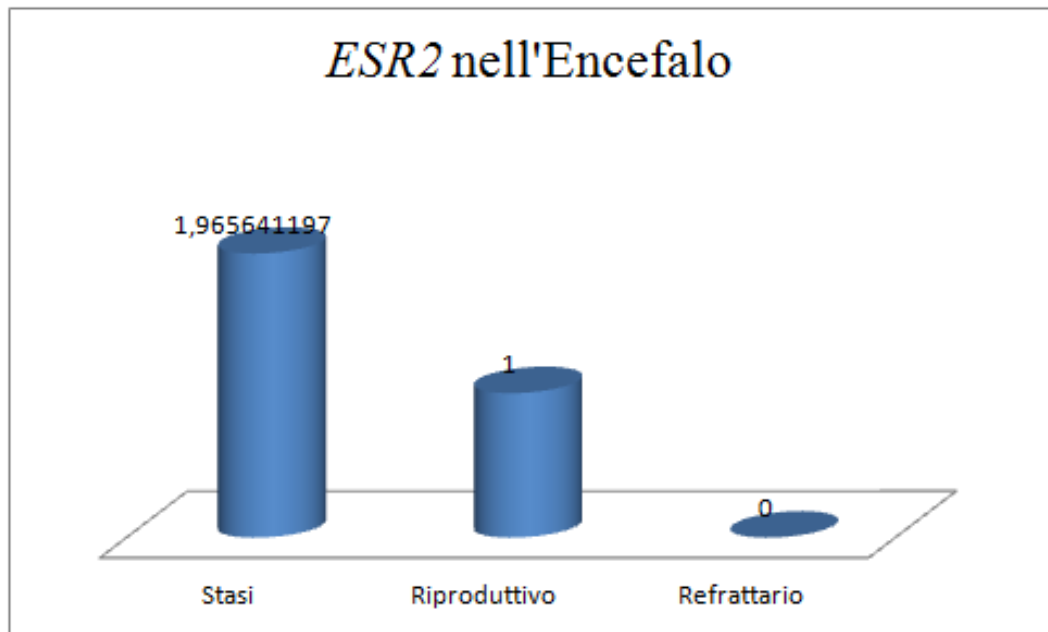


**Figura 53:** Livelli di espressione relativa del gene *PPARG* mediante *Real Time* PCR nell'encefalo di *Podarcis sicula*. I dati sono normalizzati rispetto al gene *housekeeping* 12S. I valori rappresentano una media di tre esperimenti indipendenti.

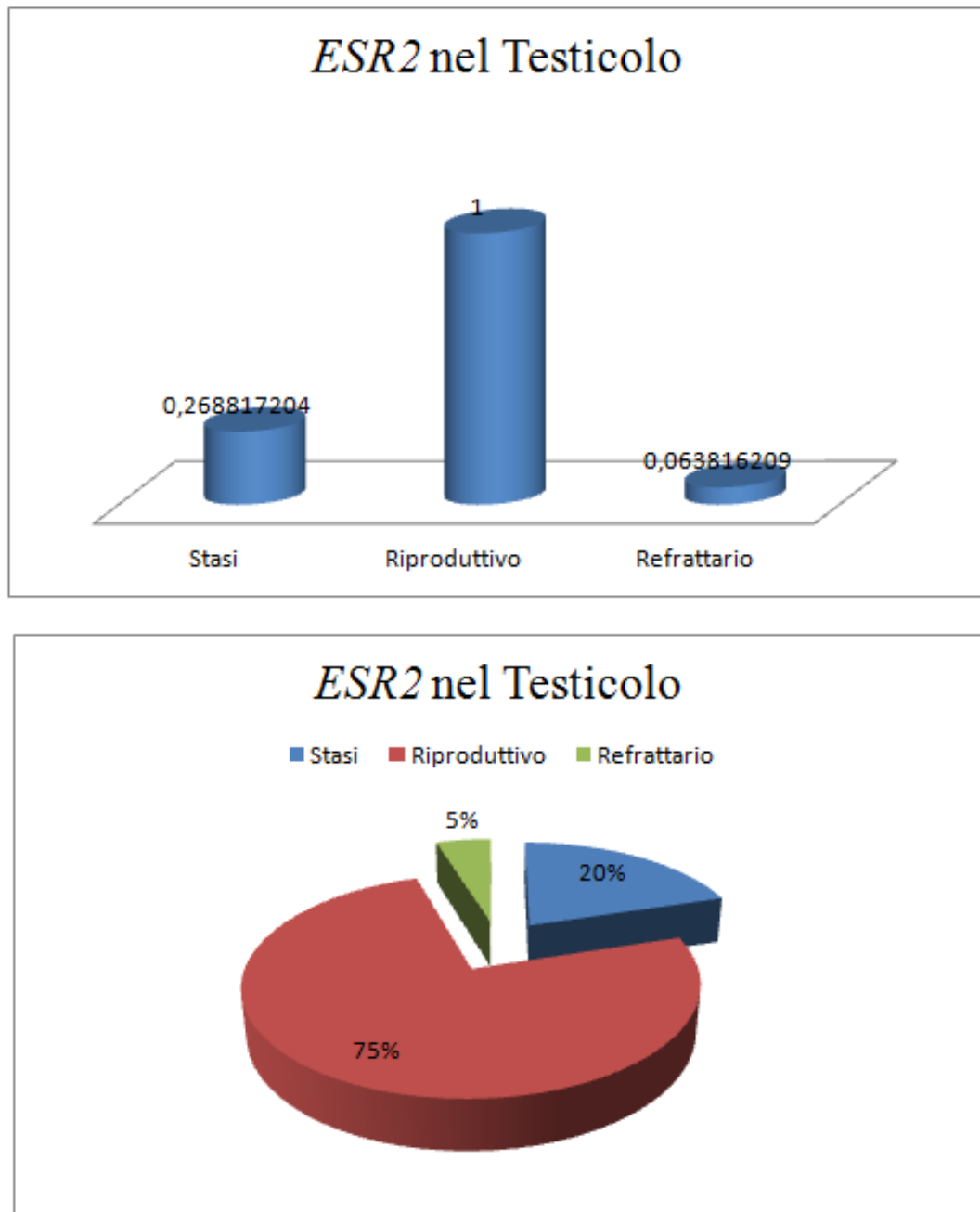


**Figura 54:** Livelli di espressione relativa del gene *PPARG* mediante *Real Time* PCR nel testicolo di *Podarcis sicula*. I dati sono normalizzati rispetto al gene *housekeeping* 12S. I valori rappresentano una media di tre esperimenti indipendenti.

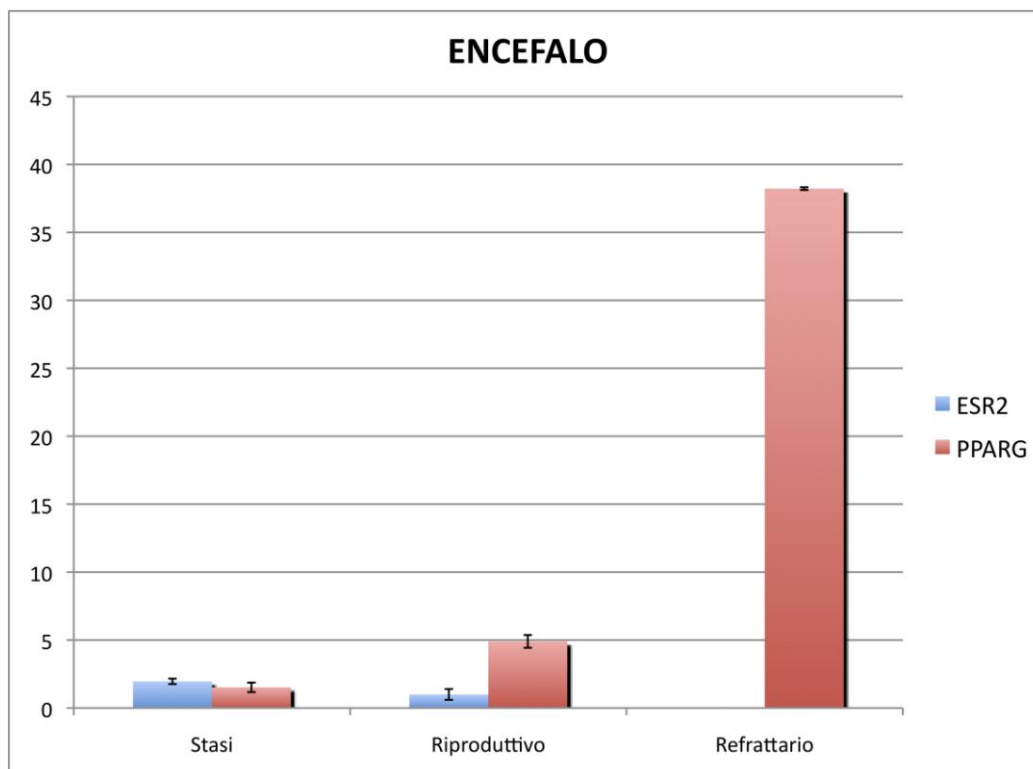




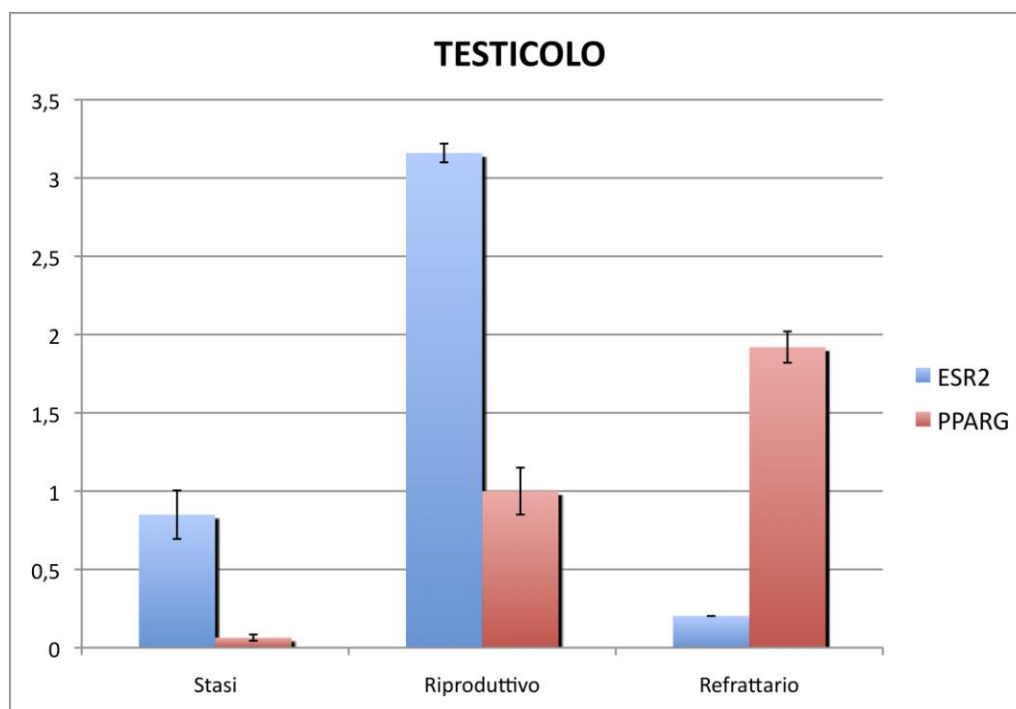
**Figura 55:** Livelli di espressione relativa del gene *ESR2* mediante *Real Time* PCR nell'encefalo di *Podarcis sicula*. I dati sono normalizzati rispetto al gene *housekeeping* 12S. I valori rappresentano una media di tre esperimenti indipendenti.



**Figura 56:** Livelli di espressione relativa del gene *ESR2* mediante *Real Time* PCR nel testicolo di *Podarcis sicula*. I dati sono normalizzati rispetto al gene *housekeeping* 12S. I valori rappresentano una media di tre esperimenti indipendenti.

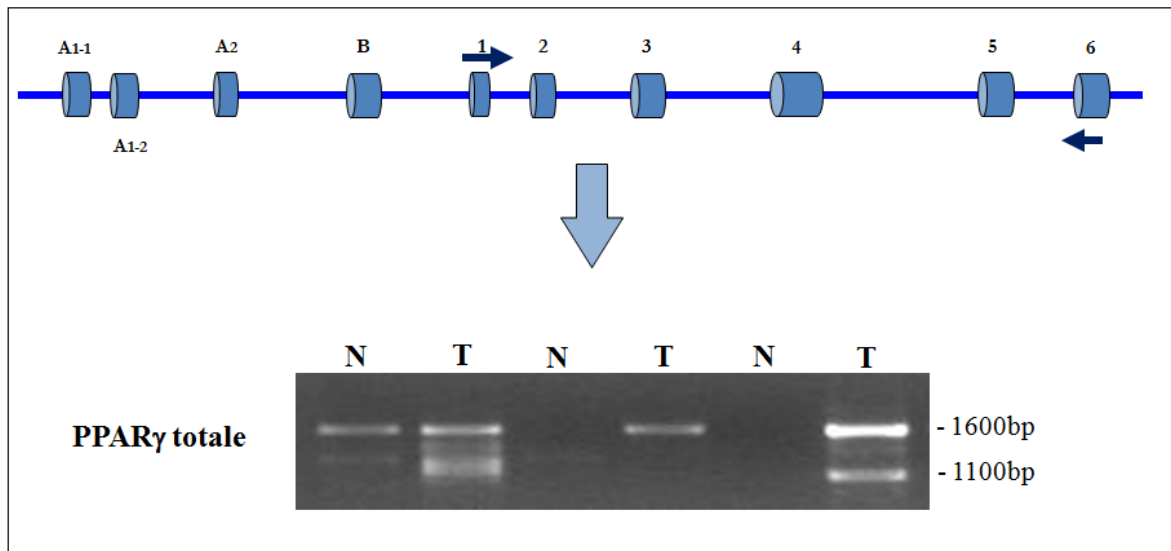


**Figura 57:** Livelli di espressione relativa dei geni *PPARG* e *ESR2* mediante *Real Time* PCR nell'encefalo di *Podarcis sicula*. I dati sono normalizzati rispetto al gene *housekeeping* 12S. I valori rappresentano una media di tre esperimenti indipendenti.

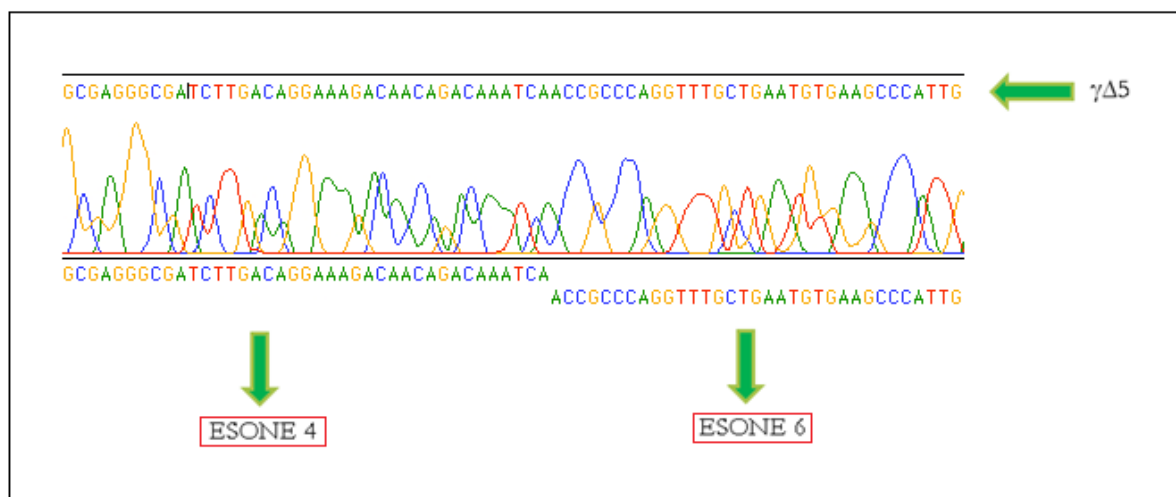


**Figura 58:** Livelli di espressione relativa dei geni *PPARG* e *ESR2* mediante *Real Time* PCR nel testicolo di *Podarcis sicula*. I dati sono normalizzati rispetto al gene *housekeeping* 12S. I valori rappresentano una media di tre esperimenti indipendenti.

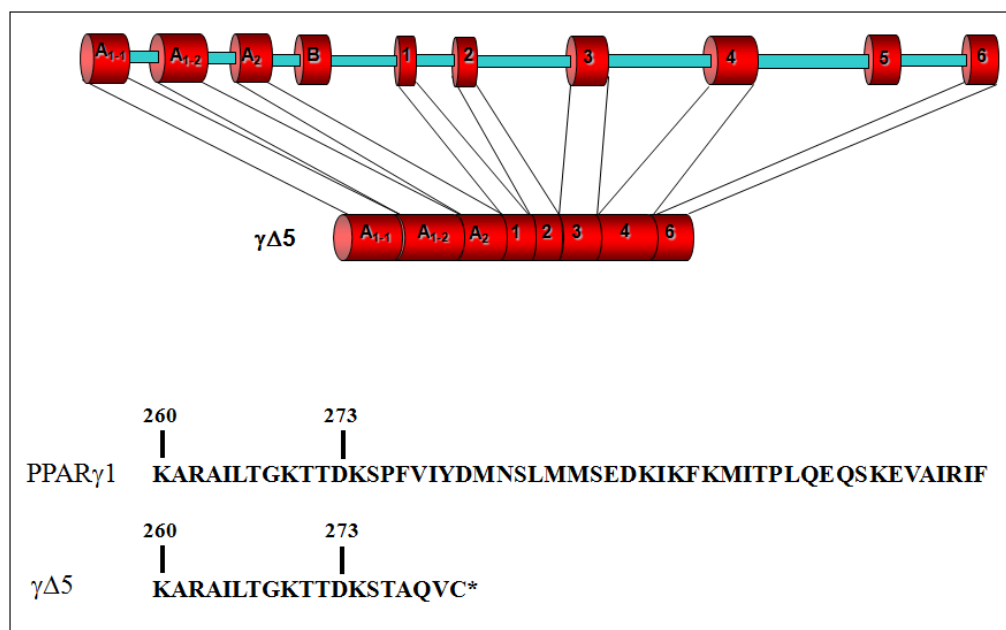




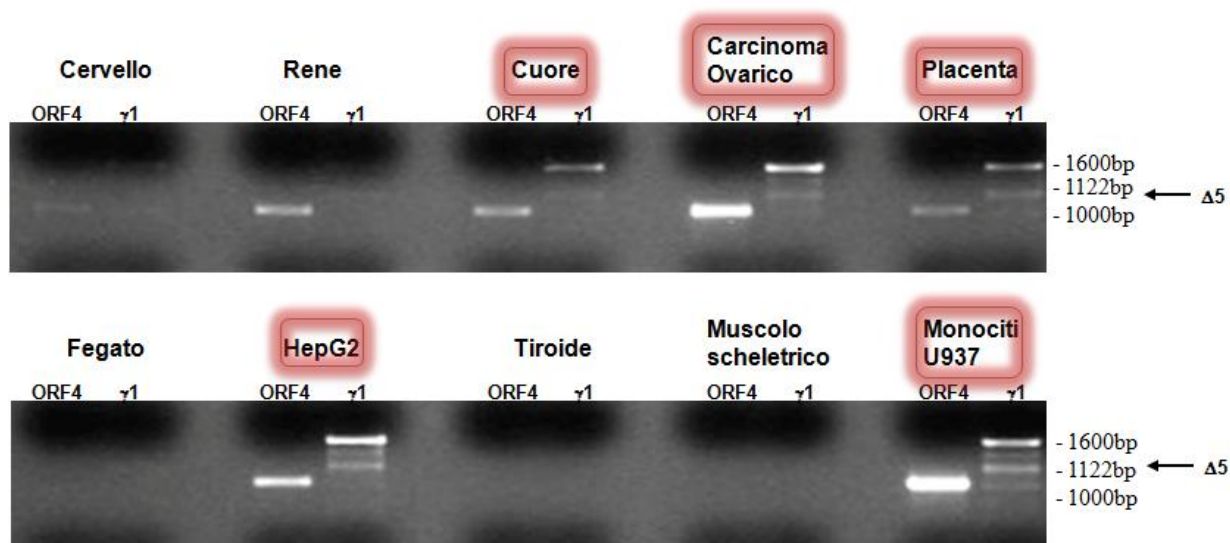
**Figura 61:** I cDNA ricavati da campioni di RNA provenienti da tessuto normale e tumorale di colon sono stati amplificati, mediante RT-PCR semiquantitativa, con coppie di oligonucleotidi specifici per l'intera regione codificante del gene *PPARG*, comune a tutte le isoforme conosciute ( $\gamma 1-4$ ). Il gel in basso evidenzia, oltre la banda attesa di 1600 bp, corrispondente alla forma già nota del gene *PPARG*, una seconda banda di peso molecolare inferiore di circa 1000-1100 bp, in corrispondenza del campione di tessuto tumorale.



**FIGURA 62:** Elettroferogramma del trascritto codificante l'isoforma umana  $\gamma\Delta 5$ . Tale trascritto è perfettamente identico al classico trascritto *full-length* del gene *PPARG*, ma manca di 451 bp corrispondenti all'intero esone 5.



**Figura 63:** In alto, rappresentazione schematica dei trascritti PPAR $\gamma$  e  $\gamma\Delta 5$ . In basso, lo “skipping” dell’intero esone 5 genera una proteina che manca dell’intero dominio di legame al ligando con 5 diversi amminoacidi al C-terminale.



**Figura 64:** Verifica dell’espressione tissutale del trascritto  $\gamma\Delta 5$  mediante RT-PCR semiquantitativa (30 cicli). Il trascritto  $\gamma$ ORF4 è stato utilizzato come controllo.

## **5. Discussione**



Nel recente passato è diventato sempre più evidente il coinvolgimento dei recettori nucleari PPAR $\gamma$  ed ER $\beta$  in numerose patologie che comprendono soprattutto la biologia della riproduzione, la resistenza all'insulina, l'obesità ed il cancro.

Il ruolo svolto dal recettore ormonale nucleare PPAR $\gamma$  nel metabolismo energetico è stato ben definito. Tale proteina, infatti, ha un ruolo fondamentale nell'adipogenesi e nel differenziamento delle cellule epiteliali regolando la trascrizione di numerosi geni coinvolti nel metabolismo lipidico e glucidico, nel controllo dell'omeostasi e trasporto di acidi grassi (Berger *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2004). I ligandi del recettore PPAR $\gamma$  agiscono come sensibilizzatori dell'insulina e sono utilizzati come farmaci nel trattamento del diabete di tipo II, fattore di rischio, con l'obesità, per l'infertilità maschile (Lehmann *et al.*, 1995; Barroso *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 2000, Baccetti *et al.*, 2002). Il liquido seminale contiene diversi carboidrati capaci di fornire una fonte di energia immediatamente disponibile per il metabolismo nemaspermico e per il movimento degli spermatozoi. Il metabolismo energetico dello spermatozoo include diverse vie metaboliche, ma è stato provato che l'effetto positivo del glucosio sull'acquisizione della capacità fertilizzante è soprattutto mediato dalla via dei Pentoso fosfati, in grado di generare NADPH, cofattore essenziale per la biosintesi degli acidi grassi. In particolare, le prostaglandine, ligandi naturali del recettore PPAR $\gamma$ , sono presenti in alte concentrazioni nel liquido seminale, e sono in grado di migliorare la capacità fecondante del gamete maschile (Templeton *et al.*, 1978; Roy and Ratnam, 1992; Aitken *et al.*, 1986; Aitken and Kelly, 1985; Shimizu *et al.*, 1998). Il recettore PPAR $\gamma$ , di recente identificato nello spermatozoo umano eiaculato, è in grado di indurre il fenomeno della capacitazione attraverso l'attivazione del *pathway* PI-3K/AKT (Aquila *et al.*, 2006).

Il *pathway* PI-3K/AKT rappresenta uno dei principali meccanismi molecolari implicati nella regolazione della sopravvivenza cellulare; come descritto nell'introduzione, dati ottenuti in diversi sistemi modello fanno pensare al recettore PPAR $\gamma$  come un gene onco-soppressore: infatti, ligandi di tale recettore possono inibire la proliferazione e indurre differenziamento ed apoptosi in molte cellule neoplastiche (Mehta *et al.*, 2000; Rosen and Spiegelman; 2001; Kopelovich *et al.*, 2002). Nella linea di carcinoma mammario ormono-dipendente, MCF7, dosi crescenti di rosglitazone, un ligando sintetico del recettore PPAR $\gamma$ , modulano positivamente l'espressione dei geni onco-soppressori p53 e PTEN, capaci di antagonizzare le vie di segnale proliferative e di sopravvivenza attivati dal recettore estrogenico ER $\alpha$ , mediante il *pathways* PI-3K/AKT (Bonofiglio *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2001; Di Cristofano and Pandolfi, 2000; Yamada and Araki, 2001).

L'ormone steroideo 17 $\beta$ -estradiolo è un regolatore chiave per la differenziazione, la proliferazione e la sopravvivenza in numerose cellule bersaglio (Clark *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 2001). Gli estrogeni sono importanti fattori di rischio per l'iniziazione di diversi tumori endocrino-correlati (Russo and Russo 1998; Deroo and Korach, 2006). Generalmente, il recettore ER $\alpha$  è in grado di promuovere le vie di segnale proliferative e l'entrata nel ciclo cellulare (Hall and McDonnell, 1999), mentre, in presenza del recettore ER $\beta$ , l'ormone E<sub>2</sub> induce la morte cellulare attraverso la rapida attivazione della proteina p38/MAPK (*p38 Mitogen-Activated Protein Kinase*), responsabile a sua volta dell'attivazione della caspasi-3 e del taglio proteolitico di PARP (*Poli ADP-Ribosio Polimerasi*), i principali effettori molecolari del processo apoptotico (Acconcia *et al.*, 2005; Marino and Ascenzi, 2008; Acconcia and Marino, 2011).

Gli estrogeni regolano la funzione riproduttiva nel maschio, con effetti positivi principalmente sulla spermatogenesi e sulla spermioistogenesi (Hess *et al.* 1997). In topi neonatali, *knock-out* per il gene *ESR1* ( $\alpha$ ERKO) le cellule germinali mostrano un numero normale di gonociti (Lubahn *et al.* 1993 Delbes *et al.* 2005), mentre l'inattivazione del recettore ER $\beta$  è in grado di influenzare la composizione cellulare del testicolo, con un aumento (maggiore del 50%) del numero di spermatogoni e di cellule di Leydig, dovuto ad un minor tasso di apoptosi e ad un più alto tasso di mitosi (Gould *et al.*, 2007). Gli estrogeni, quindi, esercitano i loro effetti sulla spermatogenesi fetale/neonatale tramite il recettore ER $\beta$ , che rappresenta, non a caso, la forma maggiormente espressa nel tratto riproduttivo maschile e nelle cellule germinali primordiali (Aquila *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2009; Rago *et al.*, 2007, Saunders *et al.*, 1998; Hess *et al.*, 2001). Nella gonade adulta, invece, gli estrogeni agiscono come potente fattore di sopravvivenza delle cellule germinali maschili. : incubando *in vitro* piccole sezioni di tubuli seminiferi, in assenza di fattori di sopravvivenza, basse concentrazioni dell'ormone 17 $\beta$ -estradiolo ( $10^{-9}$  e  $10^{-10}$  mol/L), aggiunte al mezzo di coltura, sono infatti in grado di inibire il fenomeno apoptotico (Pentikainen *et al.*, 2000). Livelli significativi di espressione del recettore ER $\beta$  negli spermatogoni sembrano offrire un'ulteriore protezione contro la circolazione di agenti cancerogeni, attraverso la regolazione di enzimi detossificanti, inoltre, la delezione completa dell'esone 3 del gene *ESR2*, codificante il primo *zinc-finger* del dominio di legame al DNA (DBD), ha recentemente dimostrato, per il recettore ER $\beta$ , un fenotipo completamente non fertile (Pettersson and Gustafsson, 2001 Antal *et al.*, 2008).

Partendo da queste considerazioni, il progetto di Dottorato di Ricerca si è interessato all'analisi del ruolo pro-apoptotico dei geni *PPARG* ed *ESR2* nei processi di proliferazione cellulare.

L'uso degli spermatogoni come modello per studiare la proliferazione cellulare diventa sempre più consistente, date le numerose evidenze di un'origine embrionale delle neoplasie testicolari, dovuta alla presenza di gonociti maligni che progrediscono dalla fase di cellule germinali primordiali sino allo stadio di cellule trasformate (Jørgensen *et al.*, 1993; Giwerzman *et al.*, 1993; Dohle, 2010). I proto-oncogeni sono attivati ormonalmente durante la spermatogenesi e sono coinvolti negli eventi trascrizionali e nel controllo della proliferazione e differenziazione delle cellule germinali durante specifiche fasi del ciclo dell'epitelio seminifero (Schultz *et al.*, 1995; Iawaoki *et al.*, 1993). La normale espressione dei proto-oncogeni è essenziale nella regolazione delle mitosi spermatogoniali, nelle meiosi degli spermatociti e nei processi di maturazione degli spermatozoi. Nel topo, i proto-oncogeni *c-fos*, *c-jun* e *c-myc* sono espressi ad alti livelli negli spermatogoni di tipo B, e le proteine MIC e JUN si ritrovano negli spermatociti all'inizio della profase della meiosi (Wolfes *et al.*, 1989). Tuttavia, sebbene la presenza di onco-proteine nei nuclei delle cellule germinali sia una caratteristica comune che attiva fisiologicamente la spermatogenesi, la localizzazione citoplasmatica di alcune onco-proteine nucleari, osservata anche nei bassi vertebrati come *R. esculenta*, è correlata al cancro, dove diverse proteine risultano de-localizzate (Chieffi *et al.*, 1995; Neyns *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996). Un recente lavoro suggerisce lo studio nella gonade maschile dell'espressione del gene onco-soppressore Chk2 - fortemente espresso nel testicolo umano sia durante la spermatogenesi che nel carcinoma *in situ* (CIS) -, per molteplici ragioni che includono, tra l'altro,: (i) la presenza, nello stesso tessuto, di eventi mitotici e meiotici del ciclo cellulare, (ii) l'alta frequenza di rotture cromosomiche della doppia elica come conseguenza fisiologica della ricombinazione meiotica, (iii) la presenza di precursori comuni nella fase iniziale del carcinoma *in situ* (CIS) (Bartkova *et al.*, 2001).

Nel progetto di Dottorato di Ricerca è stato utilizzato come modello sperimentale il rettile *Podarcis sicula*, un vertebrato non mammifero a riproduzione stagionale molto diffuso in Campania, la cui fisiologia riproduttiva è ben nota, così come il profilo annuale degli ormoni sessuali steroidei. In *Podarcis sicula* è stato identificato il recettore ER $\beta$  nei nuclei degli spermatogoni, spermatociti, spermatidi e cellule del Sertoli; il trattamento con estrogeni induce la proliferazione degli spermatogoni e l'attivazione delle chinasi ERK1/2 e Akt-1 e, nella spermatogenesi dell'animale, l'attività dei proto-oncogeni svolge un importante ruolo di controllo (Chieffi *and* Varriale, 2004; Chieffi *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 2005; Chieffi *et al.*, 2002). La spermatogenesi discontinua del rettile sessualmente maturo *Podarcis sicula*, si è rivelata una fortunata strategia di indagine per l'osservazione della crescita cellulare e di fenomeni difficilmente esaminabili in organismi più complessi come l'uomo, dove gli spermatogoni non proliferano finché non sopraggiunge la pubertà (Hadziselimovic *et al.*, 1987; Huff *et al.*, 1989, 1991; Dunkel *et al.*, 1997). Nel testicolo di *Podarcis sicula*, infatti, la massima attività proliferativa delle cellule germinali avviene solitamente in primavera, si blocca completamente nella fase refrattaria (estate) ed è successivamente rallentata in autunno-inverno. Inoltre, in *Podarcis sicula*, risulta particolarmente interessante poter osservare l'espressione dei geni pro-apoptotici *PPARG* ed *ESR2*, nell'organismo immaturo (fase refrattaria) dove, durante le mitosi spermatogoniali, si verifica un progressivo aumento dei livelli degli estrogeni. Questi dati risultano estremamente rilevanti, considerando l'ipotesi della “base fetale delle malattie dell'adulto” che precede l'insorgenza di diverse patologie, come i tumori invasivi del testicolo ed il sistematico ritrovamento dei livelli degli estrogeni stabilmente elevati nelle lesioni neoplastiche testicolari (Skakkebaek 1982). È infatti noto che l'esposizione *in utero* al momento della differenziazione testicolare è un fattore di rischio per lo

sviluppo di queste neoplasie e, sperimentalmente, la somministrazione pre-natale e post-natale agli estrogeni provoca regolarmente lo sviluppo di tumori testicolari in alcuni ceppi di roditori (Atanassova *et al.*, 1999; Fielden *et al.*, 2002; Newbold *et al.*, 2000; Bosland, 1996).

In questo lavoro di Dottorato, l'identificazione *ex-novo* dei geni *PPARG* ed *ESR2* in *Podarcis sicula* ha consentito l'analisi, mediante *Real-Time* quantitativa, dell'espressione relativa nelle tre fasi del ciclo riproduttivo, in due diversi tessuti: testicolo ed encefalo, per valutare l'eventuale ruolo di tali fattori pro-apoptotici ed anti-proliferativi nei fenomeni di crescita cellulare.

Il ruolo pro-apoptotico e anti-proliferativo del recettore ER $\beta$  è ampiamente evidenziato, anche nel riproduttore stagionale *Artibeus lituratus* dove i livelli d'espressione del recettore aumentano sensibilmente durante la fase di regressione testicolare, con un'immunoreattività gradualmente più intensa con il procedere della meiosi, nelle fasi di zigotene e pachitene - importanti *check-point* per l'apoptosi all'interno del processo di spermatogenesi - (Oliveira *et al.*, 2009; Morales and Cavicchia, 2002). La modulazione dei recettori degli ormoni sessuali steroidei da parte dei loro stessi ligandi è stata studiata in molti modelli dove gli steroidi producono risposte diverse in termini di aumento o diminuzione del recettore corrispondente (Takane *et al.*, 1990, Krongrad *et al.*, 1991; Simerly and Young, 1991; Kaneko *et al.*, 1993; Tata *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1993; Borrás *et al.*, 1994).

Nella placenta di ratto, dove sono espressi entrambi i recettori ER $\alpha$  ed ER $\beta$ , l'aumento dei livelli degli ormoni sessuali steroidei, con la progressione della gravidanza, porta ad una loro *down-regolazione*. Questo funge da meccanismo di protezione sullo sviluppo del feto poiché, alti livelli di estrogeni durante la gravidanza, non solo ritardano la crescita della placenta e del feto stesso, ma possono portare ad

anomalie del tratto riproduttivo in prole di sesso maschile (Al-Bader, 2006). Inoltre, l'incubazione con E<sub>2</sub> di cellule di carcinoma mammario MCF-7 risulta in una *down-regolazione* del recettore dell'estrogeno, osservata già 3 ore dopo il trattamento, con una massima riduzione dopo 18-24 ore, dove i livelli di mRNA sono circa il 20% in meno di quello dei controlli (Kaneko *et al.*, 1993). Nell'encefalo e nel testicolo di *Podarcis sicula*, i livelli d'espressione del gene *ESR2* decrescono, fino a non essere quasi più misurabili, nella fase refrattaria dove la concentrazione degli estrogeni, plasmatici e intragonadici, mostra un picco molto elevato che può quindi spiegare l'andamento del messaggero osservato tramite gli esperimenti di *Real-Time*.

In diversi tessuti bersaglio, gli estrogeni regolano la sintesi delle prostaglandine, ligandi naturali del recettore PPAR $\gamma$  (Ham *et al.*, 1975; Tawfik *et al.*, 1987; Wilson and Huang; 1984; Chaud *et al.*, 1994). La somministrazione dell'ormone estradiolo aumenta il metabolismo dell'acido arachidonico (precursore delle prostaglandine), inducendo la proliferazione dei perossisomi e la produzione di acidi grassi. Tra i recettori PPAR, la proteina PPAR $\gamma$ 1 è risultata quella principalmente espressa nei tessuti dove gli estrogeni inducono la proliferazione dei perossisomi (Ma *et al.*, 1998) e, nella ghiandola adiposa dell'uropigio di *Anas platyrhynchos*, il trattamento con E<sub>2</sub> genera, indirettamente, la sintesi di un potente attivatore per il recettore PPAR $\gamma$  (Ma *et al.*, 1998), che potrebbe, in parte, chiarire la pronunciata espressione del gene *PPARG* in *Podarcis sicula* evidenziata mediante gli esperimenti di *Real-Time*.

Tuttavia, la sovra-espressione del recettore PPAR $\gamma$ , rilevata durante la fase refrattaria, suggerisce, anche in *Podarcis sicula*, un forte ruolo pro-apoptotico. Durante la fase refrattaria, infatti, l'attività spermatogenetica si arresta a causa di numerose degenerazioni fra le cellule germinali in meiosi e fra gli spermatociti II: l'iper-



espressione del gene *PPARG* sembra quindi in grado di provocare e/o contribuire all'arresto del ciclo cellulare e alle estese apoptosi.

La quantificazione relativa dei livelli di espressione dei due geni, in entrambi i tessuti analizzati, ha costantemente evidenziato un aumento dell'espressione del gene *PPARG* correlata ad una drastica riduzione nell'espressione del gene *ESR2*, e viceversa. In entrambi i tessuti, encefalo e testicolo, la discrepanza maggiore tra i livelli d'espressione dei geni *PPARG* ed *ESR2* si riscontra principalmente nella fase refrattaria del ciclo riproduttivo di *Podarcis sicula*.

Recentemente, è stata attribuita una crescente importanza fisiologica al *cross-talk* negativo osservato tra i segnali proliferativi attivati dal recettore estrogenico e quelli dipendenti dai ligandi di PPAR $\gamma$  (Keller *et al.*, 1995; Qin *et al.*, 2003; Gunin *et al.*, 2004; Bonofiglio *et al.*, 2005). I recettori nucleari ER e PPAR hanno entrambi la capacità di legare la sequenza *consensus* 5'-AGGTCA- 3' presente negli elementi di risposta ERE e/o PPRE, e competere, quindi, per lo stesso sito di legame (Keller *et al.*, 1995). L'eterodimero PPAR/RXR lega infatti sequenze ERE in diversi geni "bersaglio" degli E<sub>2</sub>, come pS2 (TFF1), l'apolipoproteina II e la vitellogenina, senza tuttavia, poter attivare la trascrizione a causa di un promotore non permissivo e di sequenze fiancheggianti che influenzano negativamente l'affinità di legame (Keller *et al.*, 1995; Kliwer *et al.*, 1992; Issemann *et al.*, 1993; Nunez *et al.*, 1995). Anche i recettori degli estrogeni interferiscono negativamente con la sequenza PPRE, ostacolando la segnalazione e la trans-attivazione del recettore PPAR $\gamma$  nella linea di carcinoma mammario ormono-dipendente MCF7 (Wang *et al.*, 2002; Bonofiglio *et al.*, 2005).

Recenti esperimenti *in vitro* condotti su linee cellulari di leiomioma hanno evidenziato come solo i ligandi specifici del recettore PPAR $\gamma$  siano in grado di inibire specificamente la proliferazione delle cellule stimolata dal 17- $\beta$ estradiolo, e come

questo effetto non sia stato osservato con specifici ligandi per i recettori PPAR $\alpha$  o PPAR $\beta$  (Houston *et al.*, 2003). Inoltre, nei tessuti responsabili del controllo del metabolismo (ipotalamo, tessuto adiposo, muscolo scheletrico,  $\beta$ -cellule), dove il gene *ESR2* è espresso, si verifica un'azione negativa sulla trascrizione mediata dal recettore PPAR $\gamma$ : topi *knock-out* per il gene *ESR2* evidenziano una pronunciata attività trascrizionale del recettore PPAR $\gamma$ , in associazione con un miglioramento della sensibilità all'insulina e della tolleranza al glucosio (Foryst-Ludwig *et al.*, 2008; Yepuru *et al.*, 2010).

Sebbene l'attivazione di entrambi i recettori PPAR $\gamma$  e ER $\beta$  sia implicata nei meccanismi anti-proliferativi, pro-apoptotici e di differenziamento cellulare, sembra evidente, una associazione negativa e discordante tra le due proteine, che interferiscono, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, in una maniera mutuamente esclusiva. Lo studio dell'interazione tra i recettori nucleari ed altri fattori di trascrizione è importante per la comprensione dei meccanismi delle risposte ormonali e per la modulazione dell'espressione genica. Ulteriori studi sembrano quindi necessari per chiarire queste interazioni, dirette ed indirette, tra il gene *PPARG* ed *ESR2* nella proliferazione cellulare.

Alcuni studi hanno evidenziato un ruolo particolarmente rilevante della proteina PPAR $\gamma$  nel tumore del colon: questo ruolo si riflette nell'espressione cellulare e tessuto-specifica del recettore che risulta essere espresso nel colon in quantità uguale, se non maggiore, rispetto al tessuto adiposo (Bull *et al.*, 2003).

Durante il lavoro di Dottorato, l'analisi bioinformatica della regione 3p25 comprendente il gene *PPARG* umano, ha evidenziato 3 EST che possono dare luogo ad una nuova isoforma del recettore PPAR $\gamma$  non ancora descritta in letteratura. Il trascritto corrispondente è stato verificato per amplificazione e sequenziamento a partire da

cDNA di colon, ed è stata evidenziata la presenza di una banda secondaria di peso molecolare inferiore. E' stata quindi ipotizzata la presenza di un trascritto alternativo del gene *PPARG*, definito  $\gamma\Delta 5$ , la cui espressione risulta particolarmente elevata nel tessuto tumorale. Il trascritto  $\gamma\Delta 5$  deriva da uno *splicing* alternativo che causa lo “*skipping*” dell'intero esone 5 e genera una proteina che manca dell'intero dominio di legame al ligando con 5 diversi amminoacidi al C-terminale; la perdita di questo dominio si traduce in una mancata capacità di attivare la trascrizione dopo il legame dello specifico ligando all'eterodimero PPAR/RXR.

Questo meccanismo è stato trovato anche in altre isoforme appartenenti alla famiglia dei PPAR, come PPAR $\alpha$ , in cui lo *skipping* avviene a livello dell'esone 6 che corrisponde funzionalmente all'esone 5 di PPAR $\gamma$  (Gervois *et al.*, 1999).

Il trascritto  $\gamma$ ORF4 è generato da uno *splicing* alternativo che provoca la ritenzione di parte dell'introne 4 portando ad una proteina tronca che aggiunge, ai 273 amminoacidi canonici degli esoni 1-4, 21 amminoacidi al C-terminale, eliminando anche in questo caso l'intero dominio di legame al ligando (Sabatino *et al.*, 2005). L'isoforma  $\gamma$ ORF4 ha un effetto dominante negativo sul normale trascritto di PPAR $\gamma$ . Questo può essere spiegato considerando che l'isoforma perde il dominio di legame al ligando quindi, oltre a non poter legare il ligando, non può reclutare i coattivatori necessari per il rimodellamento della cromatina e altri fattori trascrizionali coinvolti nell'attivazione genica. Poiché però mantiene il dominio di legame al DNA ed il dominio di eterodimerizzazione, può ancora riconoscere l'elemento di risposta specifico sul DNA dopo l'eterodimerizzazione con il recettore RXR.

In analogia, la proteina codificata dal trascritto  $\gamma\Delta 5$  potrebbe agire sequestrando RXR alla proteina PPAR $\gamma$  oppure potrebbe competere con l'eterodimero per il legame

al DNA inibendo l'attivazione dei geni bersaglio ed interferendo con la capacità di PPAR $\gamma$  di inibire la crescita cellulare. Il dominio NES (*Nuclear Export Signal*), che permette il trasporto al di fuori del nucleo, è localizzato nell'esone 5 e numerosi dati di letteratura indicano la presenza esclusivamente nucleare di diversi mutanti dominanti negativi del recettore PPAR $\gamma$  (Kelly et al., 2004). È noto che le uniche mutazioni nel gene *PPARG* finora identificate in tessuti tumorali (colon) sono mutazioni nucleotidiche che hanno come risultato finale quello di abolire la funzione del dominio di legame al ligando (Sarraf et al., 1999). Alla luce di queste considerazioni e delle evidenze sperimentali è pertanto ipotizzabile che l'isoforma di *splicing*, identificata nel corso di questo lavoro di Dottorato, potrebbe fornire nuovi indizi molecolari sulla funzione e sul coinvolgimento del recettore PPAR $\gamma$  nell'eziologia e/o nella progressione dei processi di tumorigenesi nell'uomo.

## **6. Bibliografia**

Abney TO (1999) The potential roles of estrogen in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids*; 64: 610-617.

Acconcia F and Marino M., (2011) The effects of 17 $\beta$ -estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane *Frontiers in Physiology* doi: 10.3389/fphys.2011.00030.

Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalance A, Muramatsu M, Marino M. (2005) Survival versus apoptotic 17 $\beta$ -estradiol effect: role of ER  $\alpha$  and ER  $\beta$  activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol.*, 203(1):193-201.

Acevedo ML, Kraus WL.(2004) Transcriptional activation by nuclear receptors. *Essays Biochem.*;40:73-88.activity of two differentially used promoters. *J Mol Endocrinol* 10:269–277.

Anandappa SY, Sibson R, Platt-Higgins A, Winstanley JH, Rudland PS, Barraclough R (2000) Variant estrogen receptor  $\alpha$  mRNAs in human breast cancer specimens. *Int J Cancer* 88:209–216.

Anderson LA, McTernan PG, Barnett AH, and Kumar S. (2001) The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5045–5051.

Andò S., Ciarcia G., Panno M. L., Imbrogno E., Tarantino G., Buffone M., Beraldi E., Angelini F. and Botte V. (1992) Sex steroid levels in the plasma and testis during the reproductive cycle of lizard *Podarcis s. Sicula* Raf. *General and Comparative Endocrinology* 85, 1-7.

Andò S., Panno M.L., Ciarcia G., Imbrogno E., Buffone M., Beraldi E., Sisci D., Angelini F. and Botte V. (1990) Plasma sex hormone concentrations during the reproductive cycle in the male lizard *Podarcis s. sicula*. *Journal of Reproduction and Fertility* 90,353-360.

Andò S. and Aquila S. (2005) Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa *Molecular and Cellular Endocrinology* 245 1–6.

Anolik JH, Klinge CM, Brolly CL, Bambara RA, Hilf R (1996) Stability of the ligand-estrogen receptor interaction depends on estrogen response element flanking sequences and cellular factors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59:413–429.

Anwar A, McTernan PG, Anderson LA, Askaa J, Moody CG, Barnett AH, Eggo MC & Kumar S (2001) Site-specific regulation of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  by oestradiol in human adipose tissue. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 3 338–349.

Aquila S, Bonofiglio D., Gentile M., Middea E., Gabriele S., Belmonte M., Catalano S., Pellegrino M., and Andò S. (2006) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) $\gamma$  Is Expressed By Human Spermatozoa: Its Potential Role on the Sperm Physiology. *Journal of Cellular Physiology* 209:977–986.

Aquila S., Sisci D., Gentile M. Middea E., Catalano S., Carpino A., Rago V., and Ando` S. (2004) Estrogen Receptor (ER) ER $\alpha$  and ER $\beta$  Are Both Expressed in Human Ejaculated Spermatozoa: Evidence of Their Direct Interaction with Phosphatidylinositol-3-OH Kinase/Akt Pathway J Clin Endocrinol Metab 89: 1443–1451.

Aquila Saveria, Gentile Mariaelena, Middea Emilia, Catalano Stefania, and Andò Sebastiano (2005) Autocrine Regulation of Insulin Secretion in Human Ejaculated Spermatozoa Endocrinology 146(2):552–557.

Aronica SM, Katzenellenbogen BS (1993) Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. Mol Endocrinol 7:743–752.

Aschim EL, Saether T, Wiger R, Grotmol T, Haugen TB. (2004) Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol, 92:97-106.

Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L. et al. (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor- $\alpha$  in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. Diabetes 48, 1319-1327.

Aubry C., Pernin A., Favez T. et al. (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region Journal of Biological Chemistry 272, 25252–25259.

Bardin A., Boulle N., Lazennec G., Vignon F. and Pujol P. (2004) Loss of ER $\beta$  expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression Endocrine-Related Cancer 11 537–551.

Barone M., Scavo M.P., Papagni S., Piscitelli D., Guido R., Di Lena, M. Comelli, M. C., and Di Leo, A. (2010). ER $\beta$  expression in normal, adenomatous and carcinomatous tissues of patients with familial adenomatous polyposis. Scand. J. Gastroenterol. 45, 1320–1328.

Barroso I., Gurnell M., Crowley V. et al. (1999) Dominant negative mutations in human PPAR $\gamma$  associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension Nature 402, 880-883.

Barski,A., Cuddapah,S., Cui,K., Roh,T.Y., Schones,D.E., Wang,Z., Wei,G., Chepelev,I. and Zhao,K. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell, 129, 823–837.

Beatson, G.W. (1896) On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. Lancet 2, 104-107.



- Berensztein, E.B., Baquedano, M.S., Gonzalez, C.R., Saraco, N.I., Rodriguez, J., Ponzio, R., Rivarola, M.A., Belgorosky, A., (2006). Expression of aromatase, estrogen receptor alpha and beta, androgen receptor, and cytochrome P-450scc in the human early prepubertal testis. *Pediatr. Res.* 60, 740–744.
- Berger J., Leibowitz MD. (1999) Novel PPAR $\gamma$  and PPAR $\delta$  ligands produce distinct biological effects *Journal of Biological Chemistry* 274, 6718-6725.
- Berry M, Metzger D, Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promotercontext dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9:2811–2818.
- Bhattacharya N, Dufour JM, Vo MN, Okita J, Okita R & Kim KH (2005) Differential effects of phthalates on the testis and the liver. *Biology of Reproduction* 72 745–754. *Biochem. Mol. Biol.* 46, 687–698.
- Bland R. (2000) Steroid hormone receptor and action on bone. *Clin Sci*; 98: 217–40.
- Bookout Angie L., Yangsik Jeong, Michael Downes, Ruth T. Yu, Ronald M. Evans, and David J. Mangelsdorf (2006) Anatomical Profiling of Nuclear Receptor Expression Reveals a Hierarchical Transcriptional Network *Cell* 126, 789–799.
- Bord S, Horner A, Beavan S, et al. (2001) Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab*;86:2309–14.
- Bosland MC (1996). Hormonal factors in carcinogenesis of the prostate and testis in humans and in animal models. *Prog Clin Biol Res* 394: 309-352.
- Bourdeau V, Deschenes J, Metivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH & Mader S (2004) Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Molecular Endocrinology* 18 1411–1427.
- Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. 1996 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996 Jan; 137(1):354-66.
- Brand H, Kos M, Denger S, Flouriot G, Gromoll J, Gannon F, Reid G (2002) A novel promoter is involved in the expression of estrogen receptor  $\alpha$  in human testis and epididymis. *Endocrinology* 143:3397–3404.
- Braun RE (1998) Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9:483–489.
- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389:753–758.

Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15:2174–2183.

Carreau S (2003) Estrogens—male hormones? *Folia Histochem Cytobiol* 41:107–111.

Carroll J.S. and Brown M. (2006) Estrogen Receptor Target Gene: An Evolving Concept *Molecular Endocrinology* 20: 1707–1714.

Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, Eeckhoutte J, Shao W, Hestermann EV, Geistlinger TR, Fox EA, Silver PA, Brown M (2005) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 122:33–43.

Casabiell X, Pineiro V, Peino R, Lage M, Camina J, Gallego R, Vallejo LG, Dieguez C, and Casanueva FF. (1998) Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2149–2155.

Castillo G., Brun RP., Rosenfield J. et al. (1999) An adipogenic cofactor bound by the differentiation domain of PPAR $\gamma$  *EMBO Journal* 18, 3676-3687.

Chang EC, Frasor J, Komm B & Katzenellenbogen BS (2006) Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Endocrinology* 147 4831–4842.

Chawla A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866–1870.

Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S (1999) Phosphorylation of human estrogen receptor by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol* 19:1002–1015.

Chu S & Fuller PJ (1997) Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 132 195–199.

Chu S, Mamers P, Burger HG & Fuller PJ (2000) Estrogen receptor isoform gene expression in ovarian stromal and epithelial tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 1200–1205.

Ciarcia G., Angelini F., Polzonetti A., Zerani M. and Botte V. (1985) Hormones and reproduction in the lizard *Podarcis s. sicula* Raf. *Endocrine Regulations and Adaptive Mechanism to the Environment* 95-100. Eds Assenmacher I & Boissin J. Paris: CNRS.

Ciarcia, G.(1993). Control of testicular activity in the lizard *Podarcis s. sicula*. In: *Cellular Communication in Reproduction*. Eds. F.Facchinetti, I.Henderson, R.Pierantoni and A.Polzonetti-Magni. The Journal of Endocrinology. Ltd Bristol, UK, 131-140.

Clark JH, Schrader WT, O'Malley BW (1992) Mechanisms of action of steroid hormones. In: Wilson J, Foster DW (eds) Textbook of Endocrinology. WB Saunders Company, Philadelphia, pp 35–90.

Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H. (2004) Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med*. Nov 30;6(25):1-23.

Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM (2001) Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104:875–889.

Compston JE. (2001) Sex steroids and bone. *Physiol Rev*; 81: 419–47.

Corton J. Christopher, and Paula J. Lapinskas (2005) Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Mediators of Phthalate Ester-Induced Effects in the Male Reproductive Tract? *Toxicological Sciences* 83, 4–17 doi:10.1093/toxsci/kfi011.

Costa V., Gallo M.A., Letizia F., Aprile M., Casamassimi A. and Ciccodicola A. (2010) “PPARG: Gene Expression Regulation and Next-Generation Sequencing for Unsolved Issues” *PPAR Research*, pii: 409168.

Couse et al. 1997. Tissue distribution and qualitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinol* 138:4613-4621.

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S & Parker MG. (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry* 272 19858–19862.

Cyr M, Calon F, Morissette M, Di Paolo T (2002) Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J Psychiatry Neurosci* 27:12–27.

Dalei, S. e Mitchell, A. L. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest.*, 103 (12): 1617-1618.

Dauvois S, White R, Parker MG (1993) The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106:1377–1388.

Deroo B. J., Korach K.S., (2006) Estrogen receptors and human disease *J. Clin. Invest.* 116:561–570.

Desvergne B. and Wahli W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism *Endocrine Reviews* 20, 649-688.

Di Leo A, Messa C, Cavallini A, Linsalata M (2001) Estrogens and colorectal cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 1:1–12.

Di Renzo J, Sodeestrom M, Kurokawara R et al. (1997) Peroxisome proliferatoractivated receptors and retinoic acid receptors differentially control the

interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressor. *Molecular Cell Biology*, 17, 2166-2176.

Dieudonné M.N., Leneuve M. C., Giudicelli Y., and Pecquery R. (2004) Evidence for functional estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C655–C661.

Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. (1999) Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Cancer Res.* Feb 1;59(3):529-32.

Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA (1998) Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem* 273:29321–29330.

Drummond AE, Baillie AJ & Findlay JK (1999) Ovarian estrogen receptor alpha and beta mRNA expression: impact of development and estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology* 149 153–161.

Dulaimi, E., Hillinck, J., Ibanez de Caceres, I., Al-Saleem, T. and Cairns, P.(2004) Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients *Clin Cancer Res* 10, 6189-93.

Dulaimi, E., Ibanez de Caceres, I., Uzzo, R. G., Al-Saleem, T., Greenberg, R. E., Polascik, T. J., Babb, J. S., Grizzle, W. E. and Cairns, P. (2004) Promoter hypermethylation profile of kidney cancer *Clin Cancer Res* 10,3972-9.

Dunkel L, Hirvonen V, Erkkila K. (1997) Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death Differ.* 4:171–179.

Dym M, Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308–326.

Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubhan, D.B. & Korach, K.S. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796–805.

Elbrecht A, Chen Y, Cullinan CA, Hayes N, Leibowitz M, Moller DE, Berger J. (1996) Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 16;224(2):431-7.

Elstner E., Müller C., Koshizuka K. et al. (1998) Ligands for PPAR $\gamma$  and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BX mice *PNAS* 95, 8806-8811.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure,

chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258–4265.

Fajas L., Auboeuf D., Raspe E. et al. (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene *Journal of Biological Chemistry* 272, 18779–18789.

Fejes-Toth G, Pearce D, Naray-Fejes-Toth A (1998) Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2973–2978.

Ferro P, Forlani A, Muselli M, Pfeffer U. (2003) Alternative splicing of the human estrogen receptor alpha primary transcript: mechanisms of exon skipping *Int J Mol Med*. Sep;12(3):355–63.

Flouriot G, Griffin C, Kenealy M, Sonntag-Buck V, Gannon F (1998) Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor  $\alpha$  gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol Endocrinol* 12:1939–1954.

Forest M, Cathiard AM and Bertrand JA (1973) Evidence of testicular activity in early infancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37: 148–151.

Forman BM., Tontonoz P., Chen J. et al. (1995) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$  *Cell* 83, 803–812.

Fox EM, Davis RJ & Shupnik MA (2008) ER $\beta$  in breast cancer – onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* 73 1039–1051.

Francis G.A., Fayard E., Picard F. and Auwerx J., (2003) Nuclear receptors and the control of metabolism *Annual Review of Physiology*, vol. 65, pp. 261–311.

Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS (2003) Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144:4562–4574.

Froment P, F Gizard, D Defever, B Staels, J Dupont and P Monget (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition *Journal of Endocrinology* 189, 199–209.

Gaskell TL, Robinson LL, Groome NP, Anderson RA, Saunders PTK. (2003). Differential expression of two estrogen receptor  $\beta$  isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 88:424–432.

Gearing KL., Crickmore A., Gustafson J et al. (1994) Structure of the mouse peroxisome proliferator receptor  $\alpha$  gene *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 255–263.

Gennari L, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Massart F, Brandi ML (2002) Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81:1–24.

Giguère V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.* Oct;20(5):689-725. Review.

Gist, D.H., Bradshaw, S., Morrow, C.M., Congdon, J.D., Hess, R.A., (2007). Estrogen response system in the reproductive tract of the male turtle: an immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 27–33.

Giwercman A, Andrews PW, Jorgensen N, Muller J, Graem N, Skakkebaek NE (1993) Immunohistochemical expression of embryonal marker TRA-1–60 in carcinoma in situ and germ cell tumors of the testis. *Cancer* 72:1308–1314.

Giwercman A, Carlsen E, Keiding N, Skakkebaek NE. (1993) Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. *Environ Health Perspect.* 101 Suppl 2:65-71.

Glass CK. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers *Endocrinology Reviews* 15, 391-407.

Gosden JR, Middleton PG, Rout D (1986) Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 43:218–220.

Goyal, H.O., Bartol, F.F., Wiley, A.A., Neff, C.W., (1997). Immunolocalization of receptors for androgen and estrogen in male caprine reproductive tissues: unique distribution of estrogen receptors in efferent ductule epithelium. *Biol. Reprod.* 56, 90–101.

Graham JD, Bain DL, Richer JK, Jackson TA, Tung L, Horwitz KB (2000) Thoughts on tamoxifen resistant breast cancer. Are coregulators the answer or just a red herring? *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:255–259.

Grandien K (1996) Determination of transcription start sites in the human estrogen receptor gene and identification of a novel, tissue specific, estrogen receptor-mRNA isoform. *Mol Cell Endocrinol* 116:207–212.

Grandien K, Backdahl M, Ljunggren O, Gustafsson JA, Berkenstam A (1995) Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology* 136:2223–2229.

Grandien KF, Berkenstam A, Nilsson S, Gustafsson JA (1993) Localization of DNase I hypersensitive sites in the human oestrogen receptor gene correlates with the transcriptional activity of two differentially used promoters. *J Mol Endocrinol* 10:269–277.

- Griekspoor A., Zwart W., Neefjes J. and Michalides R. (2007) Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells NRS, Vol 5, DOI: 10.1621/NRS.050003.
- Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H & Neyses L (1997) Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. FEBS Letters 416 107–112.
- Grumbach MM (2000) Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. J Pediatr Endocrinol Metab 13(Suppl 6): 1439–1455.
- Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R. and Young, R. A. (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells Cell 130, 77-88.
- Guerriero G. (2009). Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. Annals New York Academy of Sciences 1163: 154-68.
- Gustafsson J-Ar (1999) Estrogen receptor  $\beta$  – a new dimension in estrogen mechanism of action Journal of Endocrinology 163, 379–383.
- Hadziselimovic F, Herzog B and Buser M (1987) Development of cryptorchid testes. Eur. J. Pediatr. 146 (Suppl 2): 8-12.
- Hall JM and McDonnell DP. (1999) The estrogen receptor beta isoform (ER $\beta$ ) of the human estrogen receptor modulates ER $\alpha$  transcriptional activity, and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. Endocrinology 140: 5566–5578.
- Hall JM., Couse JF., and Korach KS (2001) The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling The Journal of Biological Chemistry Vol. 276, No. 40, Issue of October 5, pp. 36869–36872.
- Hase T, Yoshimura R, Mitsuhashi M, Segawa Y, Kawahito Y, Wada S, Nakatani T, Sano H (2002) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists.. Urology. Sep;60(3):542-7.
- Hawkins M.B., Thornton J.W., Crews D., Skipper J.K., Dotte A. and P. Thomas (2000) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Proc Natl Acad Sci U S A 97(20): 10751-6.
- Hayashido Y, Lucas A, Rougeot C, Godyna S, Argraves WS & Rochefort H (1998) Estradiol and fibulin-1 inhibit motility of human ovarian- and breast-cancer cells induced by fibronectin. International Journal Cancer 75 654–658.
- Hejmej, A., Gorazd, M., Kosiniak-Kamysz, K., Wiszniewska, B., Sadowska, J., Bilinska, B., (2005). Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry. Domest. Anim. Endocrinol. 29, 534–547.



Herman JB., Baylin SB. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003 Nov 20;349(21):2042-54.

Hess RA (1990) Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium; light microscopic observations of perfusion-fixed and plasticembedded testes. *Biol Reprod* 43:525–542.

Hess RA, Bunick D, Bahr J. (2001). Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract. *Mol Cell Endocrinol* 178:29–38.

Hess RA, Bunick D, Lubahn DB, Zhou Q, Bouma J. (2000). Morphologic change in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor alpha knockout mice. *J Androl* 21:107–121.

Hess RA, Gist DH, Bunick D, Lubahn DB, Farrell A, Bahr J, Cooke PS & Greene GL (1997) Estrogen receptor ( $\alpha$  and  $\beta$ ) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *Journal of Andrology* 18 602–611.

Hess RA. (2003). Estrogen in the male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:52.

Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K (2001) The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor  $\beta$ (ER  $\beta$ ) gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78:33–40.

Hirata S., Shoda T., Kato J., Hoshi K. (2002) Novel isoforms of the mRNA for human female sex steroid hormone receptors *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 83(1-5):25-30.

Hirata, S., Shoda, T., Kato, J. e Hoshi, K. (2003). Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol. Metabol.*, 14 (3): 124-129.

Hiroshi Sugiura, Tatsuya Toyama, Yasuo Hara, Zhenhuan Zhang, Shunzo Kobayashi, Yoshitaka Fujii, Hirotaka Iwase and Hiroko Yamashita (2007) Expression of Estrogen Receptor b Wild-type and its Variant ERbcx/b2 is Correlated with Better Prognosis in Breast Cancer *Jpn J Clin Oncol*;37(11)820–828.

Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW (1989) Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244:76–79.

Houston Kevin D., Copland John A., Broaddus Russell R., Gottardis Marco M., Fischer Susan M., and Walker Cheryl Lyn (2003) Inhibition of Proliferation and Estrogen Receptor Signaling by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Ligands in Uterine Leiomyoma. *Cancer Research* 63, 1221–1227.

Htun H, Barsony J, Renyi I, Gould DL, Hager GL (1996) Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4845–4850.

Huff DS, Hadziselimovic F, Snyder HM, III, Duckett JW and Keating MA (1989) Postnatal testicular maldevelopment in unilateral cryptorchidism. *J. Urol.* 142: 546-548.

Huff DS, Hadziselimovic F, Snyder HMI, Blyth B and Duckett JW (1991) Early postnatal testicular maldevelopment in cryptorchidism. *J. Urol.* 146: 624-626.

Huseby RA (1976). Estrogen-induced Leydig cell tumor in the mouse model system for the study of carcinogenesis and hormone dependency. *J Toxicol Environ Health* 1: 177-192.

Ijpenberg A., Jeannin E., Wahli W. et al. (1997) Polarity and specific sequence requirements of PPAR-RXR heterodimer binding to DNA: a functional analysis of the malic enzyme gene PPRE *Journal of Biological Chemistry* 272, 20108-20117.

Inoue S, Ogawa S, Horie K, Hoshino S, Goto W, Hosoi T, Tsutsumi O, Muramatsu M & Ouchi Y (2000) An estrogen receptor beta isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERalpha and ERbeta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279 814–819.

Issemann I. and Green S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators *Nature* 347, 645-650.

Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB (1997) The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 11:693–705.

Jarvinen TA, Peltö-Huikko M, Holli K, Isola J (2000) Estrogen receptor  $\alpha$  is coexpressed with ER $\beta$  and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 156:29–35.

Jefferson WN, Couse JF, Banks PE, Korach S, Newbold RR. (2000). Expression of estrogen receptor  $\beta$  is developmentally regulated in reproductive tissue of male and female mice. *Biol Reprod* 62:310–317.

Jensen and Jacobson HI (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18:387–414.

Jensen and, Jacobson HI (1960) Fate of steroidal estrogens in target tissues. In: Pincus G, Vollmer EP, eds. *Biological activities of steroids in relation to cancer*. New York: Academic Press; 161–174.

Kang HY, Yeh S, Fujimoto N, Chang C (1999) Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor. *J Biol Chem* 274:8570–8576.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the

two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9:1603–1614.

Keaveney M, Klug J, Dawson MT, Nestor PV, Neilan JG, Forde RC, Gannon F (1991) Evidence for a previously unidentified upstream exon in the human oestrogen receptor gene. *J Mol Endocrinol* 6:111–115.

Kersten S. and Wahli W. (2000) Peroxisome proliferators activated receptor agonists EXS 89, 141-151.

Kersten S., B. Desvergne, W. Wahli, (2000) Roles of PPARs in health and disease, *Nature* 405 421–424.

Kim, T. H., Barrera, L. O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M. A., Richmond, T. A., Wu, Y., Green, R. D. and Ren, B. (2005) A high-resolution map of active promoters in the human genome *Nature* 436, 876-80.

Kininis Miltiadis and Kraus W. Lee (2008) A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis *Nuclear Receptor Signaling* Vol. 6 DOI: 10.1621/nrs.06005.

Kininis, M., Chen, B. S., Diehl, A. G., Isaacs, G. D., Zhang, T., Siepel, A. C., Clark, A. G. and Kraus, W. L. (2007) Genomic analyses of transcription factor binding, histone acetylation, and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters *Mol Cell Biol* 27, 5090-104.

Kirma et al. (1999). Aromatase overexpression leads to breast hyperplasia in females and gynecomastia and testicular cancer in males. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 40: 378.

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC 1988 A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res* 16:647–663.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. (1986) An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*;46(7):1053-61.

Kliwer S.A., K. Umesono, D.J. Noonan, R.A. Heyman, R.M. Evans, (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors, *Nature* 358 771–774.

Klock G, Strahle U, Schutz G (1987) Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* 329: 734–736.

Kos M, Denger S, Reid G, Gannon F (2002) Upstream open reading frames regulate the translation of the multiple mRNA variants of the estrogen receptor  $\alpha$ . *J Biol Chem* 277:37131–37138.

Kos Martin, Reid George, Denger Stefanie, And Gannon Frank (2001) Minireview: Genomic Organization of the Human ER $\alpha$  Gene Promoter Region Molecular Endocrinology 15(12):2057–2063.

Krey G., Braissant O., L'Horsset F. et al. (1997) Fatty acids, eicosanoids and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. Molecular Endocrinology 11, 779-791.

Kubota T., Koshizuka K., Williamson Elizabeth A. (1998) Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  (Troglitazone) Has Potent Antitumor Effect against Human Prostate Cancer Both in Vitro and in Vivo Cancer Res 1998;58:3344-3352.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology 138 863–870.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . Endocrinology 139:4252–4263.

Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P 1987 Functional domains of the human estrogen receptor. Cell 51:941–951.

Kushner P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M. and Webb P. (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1 J Steroid Biochem Mol Biol 74, 311-7.

Laudet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stéhelin D. (1992) Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. EMBO J. Mar;11(3):1003-13.

Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gensch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW (1998) Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of NCoR and SMRT complexes. Proc Natl Acad Sci USA 95:2920–2925.

Leblond CP, Clermont Y (1952) Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulfuric acid' technique. Am J Anat 90:167–206.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem. Jun 2;270(22):12953-6.

Leung YK, Mak P, Hassan S & Ho SM (2006) Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. PNAS 103:13162–13167.

Lewandowski S., Kalitaa K., Kaczmarek L. (2002) Estrogen receptor  $\beta$  Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms FEBS Letters 524 1-5.

Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. (1998) Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res.* Aug 1;58(15):3197-201.

Li H, Papadopoulos V, Vidic B, Dym M, Culty M. (1997). Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology* 138:1289-1298.

Li LC, Yeh CC, Nojima D, Dahiya R.(2000) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta promoter. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 28;275(2):682-9.

Lim SK, Won YJ, Lee HC, et al. (1999) A PCR analysis of ERalpha and ERbeta mRNA abundance in rats and the effect of ovariectomy. *J Bone Miner Res*;14:1189–96.

Lin Chin-Yo, Ström Anders, Berlian Vega Vinsensius, Kong Say Li, Yeo Ai Li, S Thomsen Jane, Chan Wan Ching, Doray Balraj, Bangarusamy Dhinoth K, Ramasamy Adaikalavan, Vergara Liza A, Tang Suisheng, Chong Allen, Bajic Vladimir B, Miller Lance D, Gustafsson Jan-Åke, and Liu Edison T (2004) Discovery of estrogen receptor  $\alpha$  target genes and response elements in breast tumor cells *Genome Biol.* 2004; 5(9): R66.

Lu B, Leygue E, Dotzlaw H, Murphy LJ, Murphy LC & Watson PH (1998) Estrogen receptor-beta mRNA variants in human and murine tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology* 138 199–203.

Luconi M, Muratori M, Forti G, Baldi E. (1999) Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:1670–1678.

Ma H, Sprecher HW & Kolattukudy PE (1998) Estrogen induced production of a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand in a PPARgamma-expressing tissue. *Journal of Biological Chemistry* 273 30131–30138.

Ma H, Tam QT & Kolattukudy PE (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR-gamma1) as a major PPAR in a tissue in which estrogen induces peroxisome proliferation. *FEBS Letters* 434 394–400.

Maglich JM, Sluder A, Guan X, Shi Y, McKee DD, Carrick K, Kamdar K, Willson TM, Moore JT. (2001) Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes *Genome Biology*, 2(8):research0029.1–0029.7.

Mangelsdorf DJ, Evans RM. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* Dec 15;83(6):841-50.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. Dec 15;83(6):835-9.

Mansen A., Guardiola-Diaz H., Rafter J. et al.(1996) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in the mouse colonic mucosa *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222,844-851.

Marino, M., and Ascenzi, P. (2008). Membrane association of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  influences 17 $\beta$ estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73, 853–858.

Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka H, Kanou H, Shimaya E, Hashimoto S, Kato S & Kawashima H (1998) A novel isoform of rat estrogen receptor with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246 142–147.

Matsuda K.-I., Ochiai I., Nishi M., And Kawata M. (2002) Colocalization and Ligand-Dependent Discrete Distribution of the Estrogen Receptor (ER) $\alpha$  and ER $\beta$  *Molecular Endocrinology* 16: 2215–2230.

McDonnell DP, Vegeto E, O'Malley BW (1992) Identification of a negative regulatory function for steroid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10563–10567.

McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1999) Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Apr-Jun;69(1-6):3-12.

McKenna, N.J., Lanz, R. B. & O'Malley, B. W. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20, 321–344.

McKinnell, C., Saunders, P.T., Fraser, H.M., Kelnar, C.J., Kivlin, C., Morris, K.D., Sharpe, R.M., (2001). Comparison of androgen receptor and oestrogen receptor beta immunoexpression in the testes of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) from birth to adulthood: low androgen receptor immunoexpression in Sertoli cells during the neonatal increase in testosterone concentrations. *Reproduction* 122, 419–429.

McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, de Kretser DM, Robertson DM (1996) The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol* 148:1–9.

Mehta RG., Williamson E., Patel MK. et al. (2000) A ligand of PPAR $\gamma$ , retinoids and prevention of preneoplastic mammary lesions *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 418-423.

Métivier Raphaël, George Reid and Frank Gannon (2006) Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression *EMBO reports* 7, 161–167. doi:10.1038/sj.embor.7400626.

Metzger D, Ali S, Bornert JM, Chambon P (1995) Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem* 270:9535–9542.

Michalik L., Desvergne B. and Wahli W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories *Nature Reviews Cancer* 4, 61-70.

Michalik L., Desvergne B., Dreyer C. et al. (2002) PPAR expression and function during vertebrate development *Int. J. Dev. Biol.* 46, 105-114.

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15:1292–1300.

Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F (1998) Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J* 17:2008–2018.

Mitchell RT, Saunders PT, Sharpe RM, Kelnar CJ, Wallace WH. Male fertility and strategies for fertility preservation following childhood cancer treatment. *Endocr Dev.* 2009;15:101-34.

Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, et al. (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*;247:75–8.

Moore JT. (2001) Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes *Genome Biology*, 2(8):research0029.1–0029.7.

Morani A, Warner M & Gustafsson JA (2008) Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alpha and beta in epithelial tissues. *Journal of Internal Medicine* 264 128–142.

Mosselman S., Polman J, Dijkema R (1996) ER $\beta$ : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor *FEBS Letters* 392 49-53.

Mueller E, Smith M, Sarraf P, Kroll T, Aiyer A, Kaufman DS, Oh W, Demetri G, Figg WD, Zhou XP, Eng C, Spiegelman BM, Kantoff PW. (2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 26;97(20):10990-5.

Mukherjee R., Jow L., Croston G. et al. (1997) Identification, characterization, and tissue distribution of human PPAR isoforms PPAR $\gamma$ 2 versus PPAR $\gamma$ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists *Journal of Biological Chemistry* 272, 8071-8076.



- Muller J and Skakkebaek NE (1984) Fluctuations in the number of germ cells during the late foetal and early postnatal periods in boys. *Acta. Endocrinol. (Copenh)* 105: 271-274.
- Murdoch FE, Gorski J (1991) The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 78:C103–C108.
- Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Coutts A, Watson P 1998 The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:175–180.
- Mutembei, H.M., Pesch, S., Schuler, G., Hoffmann, B., (2005). Expression of oestrogen receptors alpha and beta and of aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reprod. Domest. Anim.* 40, 228–236.
- Nie, R., Zhou, Q., Jassim, E., Saunders, P.T., Hess, R.A., (2002). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. *Biol. Reprod.* 66, 1161–1168.
- Nojima, D., Li, L. C., Dharia, A., Perinchery, G., Ribeiro-Filho, L., Yen, T. S. and Dahiya, R. (2001) CpG hypermethylation of the promoter region inactivates the estrogen receptor- $\beta$  gene in patients with prostate carcinoma *Cancer* 92, 2076-83.
- Norris JD, Fan D, Kerner SA, McDonnell DP (1997) Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11:747–754.
- O'Donnel L., Robertson K.M., Jones M.E., And Simpson E.R. (2001) Estrogen and Spermatogenesis *Endocrine Reviews* 22(3): 289–318.
- O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK & Hansen U (2004) Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular Endocrinology* 18 1859–1875.
- Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y & Muramatsu M (1998) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Research* 26 3505–3512.
- Olefsky JM. (2001) Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem.* Oct 5; 276(40): 36863-4.
- Oliveira Regiana L., Oliveira André G, A.B. Mahecha Germán, José C. Nogueira, Cleida A. Oliveira (2009) Distribution of estrogen receptors (ERa and ERb) and androgen receptor in the testis of big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* is cell- and stage-specific and increases during gonadal regression *General and Comparative Endocrinology* 161 283–292.
- Onate S.A., Boonyaratankornkit V., Spencer T.E., Tsai S.Y., Tsai M.-J, Edwards D. P., and O'Malley B.W. (1998) The Steroid Receptor Coactivator-1 Contains Multiple Receptor Interacting and Activation Domains That Cooperatively Enhance the

Activation Function 1 (AF1) and AF2 Domains of Steroid Receptors Vol. 273, No. 20, pp. 12101–12108.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354–1357.

Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, et al. (1997) Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology*;138:4509–12.

Parker MG. (1993) Steroid and related receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 5:499-504.  
Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L., and Leitman, D. C. (2004). Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res.* 64, 423–428.

Pelletier G. et al. (2000). Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.* 165: 359-370.

Pelletier, G., Luu-The, V., Charbonneau, A., Labrie, F. (1999) Cellular localization of estrogen receptor beta messenger ribonucleic acid in cynomolgus monkey reproductive organs. *Biol. Reprod.* 61, 1249–1255.

Peng B, Lu B, Leygue E, Murphy LC (2003) Putative functional characteristics of human estrogen receptor- $\alpha$  isoforms. *J Mol Endocrinol* 30:13–29.

Perissi V. and Rosenfeld M. G. (2005) Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6, no. 7, pp. 542–554.

Petersen DN, Tkalcovic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG & Brown TA (1998) Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 139:1082–1092.

Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA (2000) Estrogen receptor  $\beta$  acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 19:4970–4978.

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 1997 Sep;11(10):1486-96.

Pettersson, K., and Gustafsson, (2001) J. A. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu. Rev. Physiol.*, 63: 165–192.

Petursdottir V, Moslemi AR, Persson M, Nordborg E, Nordborg C (2001) Estrogen receptor alpha in giant cell arteritis: a molecular genetic study. *Clin Exp Rheumatol* 19:297–302.

Picard D (1998) The role of heat shock proteins in the regulation of steroid receptor function. In: Freedman LP (ed) *The Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors*. Birkhauser, Boston, pp 1–18.

Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto KR (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul* 1:291–299.

Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M (1999) Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor  $\beta$  in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J* 18: 4608–4618.

Piva R, Bianchi N, Aguiari GL, Gambari R, del Senno L (1993) Sequencing of an RNA transcript of the human estrogen receptor gene: evidence for a new transcriptional event. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:531–538.

Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P (1988) Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J* 7:3385–3388.

Poola I, Abraham J & Baldwin K (2002) Identification of ten exon deleted ERbeta mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor beta mRNA is distinct from that of estrogen receptor alpha. *FEBS Letters* 516 133–138.

Poola I, Abraham J, Baldwin K, Saunders A & Bhatnagar R (2005) Estrogen receptors beta4 and beta5 are full length functionally distinct ERbeta isoforms: cloning from human ovary and functional characterization. *Endocrine* 27 227–238.

Price RH Jr, Butler CA, Webb P, Uht R, Kushner P, Handa RJ. (2001) A splice variant of estrogen receptor beta missing exon 3 displays altered subnuclear localization and capacity for transcriptional activation. *Endocrinology*;142(5):2039-49.

Prince RL. (1994) Estrogen effects on calciotropic hormones and calcium homeostasis. *Endocr Rev*;15:301–9.

Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T (1998) Differential expression of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 58:5367–5373.

Radonjic, M., Andrau, J. C., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Kockelkorn, T. T., van Leenen, D., van Berkum, N. L. and Holstege, F. C. (2005) Genome-wide analyses reveal RNA polymerase II located upstream of genes poised for rapid response upon *S. cerevisiae* stationary phase exit *Mol Cell* 18, 171-83.

Rago Vittoria, Aquila Saveria, Panza Rocco and Carpino Amalia (2007) Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5:23.

Ramesh, R., Pearl, C.A., At-Taras, E., Roser, J.F., Berger, T., (2007). Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: effect of reducing testicular estrogen synthesis. *Anim. Reprod. Sci.* 102, 286–299.

Raymond Lo and Jason Matthews (2010) A New Class of Estrogen Receptor Beta-Selective Activators Dispatches from the Frontlines of Research-edited by John W. Nelson Volume 10, Issue 3.

Reid G, Denger S, Kos M, Gannon F (2002) Human estrogen receptor- $\alpha$ : regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci* 59:821–831.

Renaud J. P. and D. Moras, (2000)“Structural studies on nuclear receptors,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 57, no.12, pp. 1748–1769.

Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD (1995) The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med* 46:443–453.

Rice LW, Jazaeri AA, ShupnikMA (1997) Estrogen receptor mRNA splice variants in pre- and postmenopausal human endometrium and endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 65:149–157.

Ricote M., Li AC., Willson TM. et al. (1998) The PPAR $\gamma$  is a negative regulator of macrophage activation *Nature* 391,79-82.

Rieusset J., Andreelli F., Aubeuf D. et al. (1999) Insulin acutely regulates the expression of the PPAR $\gamma$  in human adipocytes *Diabetes* 48, 699-705.

Robertson KM, O'Donnell L, Jones MEE, et al. (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:7986 –7991.

Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V.(2001) How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet.* Oct;17(10):554-6.

Rody, A., Holtrich, U., Solbach, C., Kourtis, K., von Minckwitz, G., Engels, K., Kissler, S., Gatje, R., Karn, T. and Kaufmann, M. (2005) Methylation of estrogen receptor  $\beta$  promoter correlates with loss of ER- $\beta$  expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions *Endocr Relat Cancer* 12, 903-16.

Rosen ED, Spiegelman BM. (2001) PPAR $\gamma$ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*;276:37731–4.

Rosenfeld CS, Ganjam VK, Taylor Ja, Yuan X, Stieher JR, Hardy MP, Lubahn DB. (1998). Transcription and translation of estrogen receptor-b in the male reproductive tract of estrogen receptor $\beta$ -a knock-out and wylde type mice. *Endocrinology* 139:2982–2987.

Rousseau V., Becker DJ., Ongemba LN. et al. (1997) Developmental and nutritional changes of ob and PPAR $\gamma$ 2 gene expression in rat white adipose tissue *Biochemical Journal* 321, 451-456.

Russell LD (1993) Role in spermiation. In: Russell LD, Griswold MD (eds) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, Florida:269–304.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, FL.

Russo IH, Russo J (1998) Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3:49–61.

Russo M., Troncone G., Guarino F., Angelini F. And Chieffi P. (2005) Estrogen-Induced Akt-1 Activity in the Lizard (*Podarcis s. sicula*) Testis Molecular Reproduction And Development 71:52–57.

Sabatino L., Casamassimi A., Peluso G., Baron, M.V., Capacci, D., Miglior, C., Bonell, P., Pedicini A., Febbraro A., Ciccodicola A. and Colantuoni V. (2005) A novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  isoform with dominant negative activity generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 280: 26517-25.

Saji S, Sakaguchi H, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA (2001) Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland. *Endocrinology* 142:3177–3186.

Sarraf P., Mueller E., Jones D. et al. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR $\gamma$  *Nature Medicine* 4,1046-1052.

Sarraf P., Mueller E., Smith WM. et al. (1999) Loss of function mutations in PPAR $\gamma$  associated with human colon cancer *Molecular Cell* 3, 799-804.

Saunders PTK, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS & Millar MR. (2001) Differential expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular Human Reproduction*, 7 227–236.

Saunders PTL, Fisher JS, Sharpe RM, Millar MR. (1998). Expression of oestrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *J Endocrinol* 156:R13–R17.

Saunders, P.T., Millar, M.R., Macpherson, S., Irvine, D.S., Groome, N.P., Evans, L.R., Sharpe, R.M., Scobie, G.A. (2002) ER $\beta$ 1 and the ER $\beta$ 2 splice variant (ER $\beta$ 2x/ $\beta$ 2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2706–2715.

Saunders, P.T., Sharpe, R.M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irvine, D.S., Schultz Rudiger, Wei Yan, Jorma Toppari, Alfred Volkl, Jan-Åke Gustafsson, And Markku Peltö-Huikko (1999) Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Messenger Ribonucleic Acid and Protein in Human and Rat Testis. *Endocrinology* 140: 2968–2975.

- Segawa Y, Yoshimura R, Hase T, Nakatani T, Wada S, Kawahito Y, Kishimoto T, Sano H. (2002) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in human prostate cancer. *Prostate*. May 1;51(2):108-16.
- Shapiro, E., Huang, H., Masch, R.J., McFadden, D.E., Wu, X.R., Ostrer, H., (2005). Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptors alpha and beta in human fetal testis and epididymis. *J. Urol.* 174, 1695–1698. Discussion 1698.
- Sharpe RM (1998) The role of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol. Metab.* 9: 87-89.
- SharpeRM (1994) Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The Physiology of Reproduction*, ed 2. Raven Press Ltd., New York, pp 1363–1434.
- Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. (1993) cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*. Jun 1;32(21):5598-604.
- Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I (1998) Evidence for the colocalization of estrogen receptor- $\alpha$  mRNA and estrogen receptor- $\beta$  immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology* 139:5267–5270.
- Shughrue, P. J., Lane, M. V., and Merchenthaler, I. (1997) *J. Comp. Neurol.* 388, 507–525.
- Shulman AI, Mangelsdorf DJ. (2005) Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med.* Aug 11;353(6):604-15.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538–541.
- Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ (1995) Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 136:5311–5321.
- Smith L, Coleman LJ, Cummings M, Satheesha S, Shaw SO, Speirs V, Hughes TA. (2010) Expression of oestrogen receptor beta isoforms is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Biochem J.*; 429(2):283-90.
- Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER $\alpha$ -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 16:116–127.
- Springwald A., Latrich C., Skrzypczak M., Goerse R., Ortmann O., Treeck O. (2010) Identification of novel transcript variants of estrogen receptor  $\alpha$ ,  $\beta$  and progesterone receptor gene in human endometrium *Endocr* 37:415–424.

Stender, J. D., Frasor, J., Komm, B., Chang, K. C., Kraus, W. L. and Katzenellenbogen, B. S. (2007) Estrogen-regulated gene networks in human breast cancer cells: involvement of E2F1 in the regulation of cell proliferation *Mol Endocrinol* 21, 2112-23.

Stephen RL., Gustafsson MC., Jarvis M. et al. (2004) Activation of PPAR $\delta$  stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines *Cancer Research* 64, 3162-3170.

Suzuki F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S, Sasano H & Yaegashi N (2008) Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 50-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Science* 99 2365–2372.

Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, Sasano H. (2001). Expression and cellular localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2258–2262.

Taylor AH & Al-Azzawi F (2000) Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of Molecular Endocrinology* 24 145–155.

Tekmal et al. (1996). Overexpression of int-5/Aromatase in mammary glands of transgenic mice results in the induction of hiperplasia and nuclear abnormalities. *Cancer Res* 56: 3180-3185.

Thomas Kelwyn Dae-Yong Sung, Xing Chen, Winston Thompson Y. Eugene Chen, John McCarrey, William Walker, Michael Griswold (2011) Developmental patterns of PPAR and RXR gene expression during spermatogenesis. *Front Biosci (Elite Ed)* Jun 1;3:1209-20.

Thompson DA, McPherson LA, Carmeci C, deConinck EC, Weigel RJ (1997) Identification of two estrogen receptor transcripts with novel 5 exons isolated from a MCF7 cDNA library. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62:143–153.

Tontonoz P., Hu E., Devine J. (1995) PPAR $\gamma$ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *Molecular Cell Biology* 15, 351-357.

Tontonoz P., Nagy L., Alvarez GJ. et al. (1998) PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL *Cell* 93, 241-252.

Tora L, White J, Brou C, Tassett D, Webster N, Scheer E, Chambon P (1989) The human receptor has two independent transcriptional nonacidic activation functions. *Cell* 59:477–487.

Toshima J, Koji T, Mizuno K (1998) Stage-specific expression of testis-specific protein kinase 1 (TESK1) in rat spermatogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249:107–112.

Toshima J, Ohashi K, Okano I, Nunoue K, Kishioka M, Kuma K, Miyata T, Hirai M, Baba T, Mizuno K (1995) Identification and characterization of a novel protein kinase, TSK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J Biol Chem* 270:31331–31337.

Treeck O, Pfeiler G, Mitter D, Lattrich C, Piendl G & Ortmann O (2007) Estrogen receptor {beta}1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Journal of Endocrinology* 193 421–433.

Tsai S-J, Wu M-H, Chen H-M, Chuang P-C, Wing L-YC (2002) Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor. *Endocrinology* 143:2715–2721.

Tsutsumi I, Fugimori K, Nakamura RM, Mather JP, Ono T, diZerega GS. (1987) Disruption of a seminiferous epithelial function in the rat by ovarian protein. *Biol Reprod* 36:451-461.

Tsutsumi I, Toppari J, Campeau JD, diZerega GS. (1987) Reduction of fertility in the male rat by systemic treatment with follicle regulatory protein. *Fertil Steril* 47:689-695.

Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. (1994) Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev*;15:275–300.

Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP (1994) Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 8:21–30.

Umetani, N., Mori, T., Koyanagi, K., Shinozaki, M., Kim, J., Giuliano, A. E. and Hoon, D. S. (2005) Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer *Oncogene* 24, 4721-7.

Valve E, Penttila TL, Paranko J, Harkonen P (1997) FGF-8 is expressed during specific phases of rodent oocyte and spermatogonium development. *Biochem Biophys Res Commun* 232:173–177.

Van Pelt AM, De Rooij DG, Van der Burg B, Van der Saag PT, Gustafsson JA, Kuiper GC. (1999). Ontogeny of estrogen receptorbeta expression in rat testis. *Endocrinology* 140:478–483.

Venables JP, Vernet C, Chew SL, Elliott DJ, Cowmeadow RB, Wu J, Cooke HJ, Artzt K, Eperon IC (1999) T-STAR/ETOILE: a novel relative of SAM68 that interacts with an RNA-binding protein implicated in spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 8:959–969.

Vendrell JA, Magnino F, Danis E, Duchesne MJ, Pinloche S, Pons M, Birnbaum D, Nguyen C, Theillet C & Cohen PA (2004) Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation. *Journal of Molecular Endocrinology* 32 397–414.

Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lupu R (1998) Expression of estrogen receptor  $\beta$  messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res* 58:210–214.

Voegel JJ, Heine MJ, Tini M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H (1998) The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates



transactivation through CBP binding dependent and -independent pathways. *EMBO J* 17:507–519.

Vu-Dac N., Schoonjans K., Laine B. et al. (1994) Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the PPAR with its response element *Journal of Biological Chemistry* 269, 31012-31018.

Warner M., and Gustafsson, J.-A. (2010). The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases-a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 63–66.

Webb P, Valentine C, Nguyen P, Price Jr RH, Marimuthu A, West BL, Baxter JD, Kushner PJ (2003) ERbeta binds N-CoR in the presence of estrogens via an LXXLL-like motif in the N-CoR C-terminus. *Nucl Recept* 1:4.

Weigel NL, Zhang Y (1998) Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med* 76:469–479.

Weinbauer GF, Nieschlag E (1993) Hormonal control of spermatogenesis. In: de Kretser DM (ed) *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, San Diego, CA, pp 99–142.

Weiser MJ, Foradori CD & Handa RJ (2008) Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Research Reviews* 57 309–320.

Winter JSD, Faiman C, Hobson WC, Prasad AV and Reyes FI (1975) Pituitary gonadal relations in infancy. I. Patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and chimpanzee. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40: 545-551.

Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW (2001) Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through G<sub>i</sub>. *J Biol Chem* 276:27071–27076.

Ylikomi T., Bocquel M.T., Berry M., Gronemeyer H. and Chambon P. (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors *The EMBO Journal* vol. 11 no. 10 pp. 3681 – 3694.

Yoshida M, Nishi M, Kizaki Z, Sawada T, Kawata M (2002) Subcellular and subnuclear distributions of estrogen receptor  $\alpha$  in living cells using green fluorescent protein. *Acta Histochem Cytochem* 34:413–422.

Zhao C, Dahlman-Wright K & Gustafsson JA (2008) Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling* 6 e003.

Zhao C, Toresson G, Xu L, Koehler KF, Gustafsson JA & Dahlman-Wright K (2005) Mouse estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand selectivity and coactivator recruitment. *Biochemistry* 44 7936–7944.

Zhao C., Lam E. W., Sunter A., Enmark E., De Bella M.T., Coombes R.C., Gustafsson J.A and Dahlman-Wright K. (2003) Expression of estrogen receptor  $\beta$  isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene* 22, 7600–7606.

Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T., Katzenellenbogen, B.S., Hess, R.A., (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J. Androl.* 23, 870–881.

Zhu, X., Leav, I., Leung, Y. K., Wu, M., Liu, Q., Gao, Y., McNeal, J. E. and Ho, S. M. (2004) Dynamic regulation of estrogen receptor- $\beta$  expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis *Am J Pathol* 164, 2003-12.